

**Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.**

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra buněčné biologie



**Charakterizace 32,33-didehydroroflamykoinu - sekundárního  
metabolitu *Streptomyces durmitorensis***

Characterization of 32,33-didehydroroflamycoin - secondary metabolite from  
*Streptomyces durmitorensis*

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Bc. Alena Koukalová**

Školitel: doc. RNDr. Jan Černý, Ph.D.

Praha 2012

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 9. 5. 2012

Bc. Alena Koukalová

Na tomto místě bych ráda poděkovala především **doc. RNDr. Janu Černému, Ph.D.** za možnost připojit se k jeho pracovní skupině, za odborné vedení této práce, trpělivost, cenné rady a laskavý přístup. Své poděkování bych chtěla vyjádřit i **Mgr. Barboře Pavlů** za její čas, obětavost, otevřenost a ochotu kdykoliv mi poradit při zpracovávání této práce. Děkuji i ostatním členům laboratoře za vytváření přátelské atmosféry.

Ráda bych také poděkovala **RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D.** za umožnění měření fluorescenčních charakteristik a černých lipidových membrán, za jeho četné rady i pomoc, **RNDr. Vladimíru Kopeckému, Ph.D.** za provedení náročných infračervených analýz a za mé zasvěcení do principu této metody, **Mgr. Ondřeji Šebestovi** za pomoc při zpracování kolokalizačních studií a **RNDr. Zdeňku Tošnerovi, Ph.D.** za měření a uvedení do problematiky NMR. Všem bych ráda poděkovala hlavně za jejich čas a rady při zpracovávání diplomové práce. Také moc děkuji členům Laboratoře regulace genové exprese za umožnění práce s kvasinkami.

Děkuji rovněž také **RNDr. Evě Stodůlkové** za její velkou pomoc s izolací metabolitu.

Můj velký dík patří také mým rodičům, kteří mě podporují při studiu a poskytují mi potřebné zázemí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala i mým učitelům ze Základní školy Mandysova v Hradci Králové a Gymnázia Boženy Němcové v Hradci Králové, kteří mi poskytli nezbytné základy pro další studium. Děkuji též všem svým přátelům za jejich nekonečnou trpělivost, podporu a toleranci.



# Abstrakt

Streptomycety jsou půdní Gram-pozitivní vláknité bakterie, produkující širokou škálu pigmentů a biologicky aktivních látek včetně makrolidových antibiotik. Některé z nich jsou využívány v lékařství jako antibiotika a antimykotika, jiné se uplatňují v biologickém výzkumu jako molekuly vhodné pro fluorescenční značení membrán a detekci cholesterolu. Aktinomyceta *Streptomyces durmitorensis* (kmen MS405<sup>T</sup>) je bakterie izolovaná z půdních vzorků národního parku Durmitor v Černé Hoře. Produkuje sekundární metabolit 32,33-didehydroroflomykoin (DDHR), který je strukturně velmi podobný roflamykoinu a příbuzný s široce využívaným makrolidem filipinem. DDHR vykazuje cytotoxickou aktivitu vůči savčím buňkám a kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* kmene EGY48, zároveň má zajímavé fluorescenční vlastnosti. Interaguje s buněčnými membránami, díky své fluorescenci umožňuje vizualizovat některé membránové struktury (např. lysozomy), způsobuje desintegraci membrán, což vede k přestavbě aktinového a tubulinového cytoskeletu a při vyšších koncentracích k nekróze buněk. Po vazbě na cholesterol v membránách se snižuje intenzita fluorescence DDHR. Molekula se vyznačuje schopností vizualizovat aberantní lysozomy, čehož lze potenciálně úspěšně využít v diagnostice některých lysozomálně stádavých chorob.

Klíčová slova: 32,33-didehydroroflomykoin, roflamykoin, polyenní makrolid, sekundární metabolit, bioaktivní látka, *Streptomyces durmitorensis*

# Abstract

Streptomycetes are soil filamentous Gram-positive bacteria that produce wide variety of pigments and biologically active substances including macrolides. Some of them are used as very efficient antibiotics and strong antifungal agents in medicine, others have become useful tools for staining biomembranes and detecting cholesterol via their internal fluorescence. Actinomycete *Streptomyces durmitorensis* (wild type strain MS405<sup>T</sup>) is a bacteria isolated from Durmitor National Park in Montenegro soil samples. It produces secondary metabolite that has been identified as 32,33-didehydroroflamycoin (DDHR) closely related to the macrolides roflamycoin and generally used filipin. DDHR exhibits cytotoxic activity against mammalian cells and yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain EGY48. In addition it has interesting fluorescence properties allowing visualization of some membrane components. DDHR interacts with biomembranes, causes their disintegration leading to changes of the actin and tubulin cytoskeleton organization and in higher concentrations it causes cells necrosis.

DDHR-sterol interaction in cell membranes decreases fluorescence intensity of DDHR. The compound is able to fluorescently stain aberrant lysosomes and could be therefore potentially used in diagnostics of some lysosomal storage disease.

Keywords: 32,33-didehydroroflamycoin, roflamycoin, polyene macrolide, bioactive compound, secondary metabolite, *Streptomyces durmitorensis*

# Obsah

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>5</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>13</b>
1.1 Cíle práce .....	14
<b>2 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>15</b>
2.1 Sekundární metabolity.....	15
2.2 Bakterie rodu <i>Streptomyces</i> .....	16
2.2.1 <i>Streptomyces durmitorensis</i> .....	18
2.3 Makrolidy .....	21
2.3.1 Makrolid produkovaný bakterií <i>Streptomyces durmitorensis</i> .....	21
2.3.2 Využití makrolidů v medicíně .....	22
2.4 Steroly .....	24
2.4.1 Cholesterol .....	25
2.4.2 Ergosterol .....	27
2.4.3 Hopanoidy .....	27
2.5 Fluorescenční spektroskopie .....	28
2.5.1 Fluorescence .....	28
2.5.2 Využití fluorescence .....	29
2.5.3 Zhášení fluorescence .....	30
2.6 Vizualizace cholesterolu v buněčných systémech.....	31
2.6.1 Molekuly specificky interagující s cholesterolem a sloužící jako sondy .....	31
2.6.1.1 Cholesterol oxidáza .....	31
2.6.1.2 Cholesterol-dependentní cytolysiny .....	32
2.6.1.3 Cyklodextriny .....	33
2.6.1.4 Polyenová antibiotika .....	34
2.6.2 Analogy cholesterolu .....	37
2.7 Střádavě lysozomální nemoci.....	39
2.7.1 Niemann-Pickova choroba typu C .....	39
2.7.2 Gaucherova choroba .....	40
<b>3 MATERIÁL .....</b>	<b>41</b>
3.1 Seznam použitých mikroorganismů .....	41
3.2 Buněčné kultury.....	41

3.3	Kultivační média a roztoky .....	42
3.4	Pufry .....	45
3.5	Montovací média .....	47
3.6	Použité chemikálie .....	48
3.7	Laboratorní sklo a plastik .....	51
3.8	Přístroje .....	52
3.9	Software .....	53
4	<b>METODY</b> .....	<b>54</b>
4.1	Kultivace <i>Streptomyces durmitorensis</i> .....	54
4.2	Extrakce 32,33-didehydroroflamykoinu ze <i>Streptomyces durmitorensis</i> .....	54
4.3	Kultivace savčích buněk .....	55
4.4	Kultivace kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EGY48 .....	56
4.5	Kultivace bakterií <i>Escherichia coli</i> DH5α.....	57
4.6	Fixace preparátů pro fluorescenční mikroskopii.....	57
4.7	Značení buněk pro fluorescenční mikroskopii .....	58
4.7.1	Značení protilátkami.....	58
4.7.2	Značení živých buněk fluorescenčními sondami buněčných organel.....	58
4.7.3	Barvení tkáňových kultur DDHR .....	58
4.8	Fluorescenční mikroskopie připravených preparátů .....	59
4.9	Polymerase chain reaction (PCR) .....	60
4.10	Extrakce DNA z agarózového gelu .....	62
4.11	Sekvenace DNA .....	62
4.12	Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) .....	63
4.13	Spektrofluorometrie .....	64
4.13.1	Měření fluorescenčních spekter DDHR v rozpouštědlech .....	66
4.13.2	Měření závislosti fluorescence DDHR na pH .....	66
4.13.3	Měření závislosti fluorescence DDHR na jeho koncentraci.....	67
4.13.4	Měření emisního spektra DDHR v liposomech .....	68
4.13.5	Měření fluorescenčních spekter buněk Jurkat značených DDHR.....	68
4.14	Příprava multilamelárních liposomů .....	69

<b>4.15</b>	<b>Měření stability fluorescence.....</b>	<b>70</b>
<b>4.16</b>	<b>Spektrofotometrické měření nárůstu mikrobiálních kultur .....</b>	<b>70</b>
<b>4.17</b>	<b>Sledování toxicity na savčí buňky pomocí LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit .....</b>	<b>71</b>
4.17.1	Značení suspenzních buněk Jurkat pro průtokovou cytometrii .....	71
4.17.2	Značení adherentních primárních kožních fibroblastů pro průtokovou cytometrii.....	72
4.17.3	Značení HeLa buněk pro mikroskopii .....	72
<b>4.18</b>	<b>Detekce buněčné apoptózy pomocí Apoptosis Assay Kit.....</b>	<b>73</b>
<b>4.19</b>	<b>Agarózová gelová elektroforéza .....</b>	<b>74</b>
<b>4.20</b>	<b>Příprava černých lipidových membrán .....</b>	<b>74</b>
<b>4.21</b>	<b>Měření elektrické vodivosti černých lipidových membrán .....</b>	<b>76</b>
<b>4.22</b>	<b>Nukleární magnetická rezonance (NMR).....</b>	<b>77</b>
<b>4.23</b>	<b>Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR) .....</b>	<b>78</b>
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>80</b>
<b>5.1</b>	<b>Morfologie druhu <i>Streptomyces durmitorensis</i> .....</b>	<b>80</b>
5.1.1	Bakterie <i>Streptomyces durmitorensis</i> kultivovaná v tekutém LB médiu .....	80
5.1.2	Bakterie <i>Streptomyces durmitorensis</i> kultivovaná na pevných agarových půdách.....	83
<b>5.2</b>	<b>Sekvence DNA pro ověření druhu <i>Streptomyces durmitorensis</i>.....</b>	<b>87</b>
<b>5.3</b>	<b>Fluorescenční charakteristiky makrolidu DDHR.....</b>	<b>89</b>
5.3.1	Fluorescence DDHR v různých rozpouštědlech .....	89
5.3.2	Vliv pH na fluorescenční spektra DDHR.....	94
5.3.3	Závislost fluorescence DDHR na jeho koncentraci .....	96
5.3.4	Fluorescence DDHR v liposomech .....	98
5.3.5	Fluorescence DDHR na buňkách Jurkat.....	101
5.3.6	Stabilita fluorescence .....	103
<b>5.4</b>	<b>Bioaktivita.....</b>	<b>105</b>
5.4.1	Toxicita pro bakteriální a kvasinkové buňky .....	105
5.4.1.1	Vliv makrolidů na bakterii <i>Escherichia coli</i> (kmen DH5α) .....	105
5.4.1.2	Vliv makrolidů na kvasinky <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (kmen EGY48) .....	108
5.4.2	Toxicita pro savčí buňky .....	109
5.4.2.1	Buněčná linie Jurkat.....	110
5.4.2.2	Buněčná linie primárních kožních fibroblastů .....	113
5.4.2.3	Buněčná linie HeLa .....	115
5.4.3	Vliv DDHR na aktinový a tubulinový cytoskelet.....	116
5.4.4	DDHR a indukce buněčné apoptózy .....	118
5.4.5	Analýza nukleových kyselin buněk inkubovaných s DDHR .....	124

<b>5.5</b>	<b>Fluorescenční značení buněk metabolitem DDHR .....</b>	<b>126</b>
5.5.1	Fluorescenční značení HeLa buněk .....	126
5.5.2	Kolokalizace fluorescenčního signálu DDHR s buněčnými organelami .....	127
5.5.3	Značení buněk získaných z pacientů se stádavými lyzozomálními chorobami .....	135
5.5.4	Blokování transportu cholesterolu inhibitorem U18666A .....	137
5.5.5	Kolokalizace fluorescence filipinu a DDHR .....	139
<b>5.6</b>	<b>Interakce DDHR s membránou .....</b>	<b>142</b>
<b>5.7</b>	<b>Přímá detekce interakce DDHR s cholesterolem.....</b>	<b>152</b>
5.7.1	Nukleární magnetická rezonance .....	152
5.7.2	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací .....	155
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>160</b>
<b>6.1</b>	<b>Fluorescenční charakteristiky.....</b>	<b>160</b>
<b>6.2</b>	<b>Bioaktivita.....</b>	<b>164</b>
<b>6.3</b>	<b>Fluorescenční značení buněk metabolitem DDHR .....</b>	<b>168</b>
<b>6.4</b>	<b>Mechanismus vstupu DDHR do buněk a jeho interakce s membránami.....</b>	<b>170</b>
<b>6.5</b>	<b>Přímá detekce interakce DDHR s cholesterolem .....</b>	<b>173</b>
<b>6.6</b>	<b>Praktická využitelnost DDHR.....</b>	<b>174</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>176</b>
	<b>LITERATURA .....</b>	<b>178</b>

# Seznam použitých zkratek

AFM	mikroskopie atomárních sil
ATR - FTIR	infračervená spektroskopie se zeslabeným úplným odrazem
AV ČR	Akademie věd České republiky
BSA	hovězí sérový albumin
CCD	typ snímacího čipu kamer (charge-coupled device)
CFDA-SE	karboxyfluorescein diacetát succinimidylester
CMC	kritická micelární koncentrace
DAP	diaminopimelová kyselina
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol
DDHR	32,33-didehydroroflomykoin
DMEM	médium pro tkáňové kultury (z anglického Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMPC	dimyristoylfosfatidylcholin
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOSY	difúzní spektrum molekul
DPPC	dipalmytoylfosfatidylcholin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EEA1	antigen časných endozomů (Early endosome antigen 1)
EthD-1	ethidium homodimer-1
FACS	průtokový sortovací cytometr
FBS	fetální hovězí sérum
FITC	fluorescein isothiokyanát
FSC	forward scatter
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
FTMS	hmotnostní spektrometrie s Fourierovou transformací
GBA	glukocerebrosidáza
HBSS	médium pro tkáňové kultury (z anglického Hank's Balanced Salt Solution)
HEPES	kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová

HTS	podavač vzorků průtokového cytometru (z anglického high throughput sampler)
IR	infračervené záření
ITS	spojovací genomová sekvence mezi geny pro 16S a 23S rRNA (z anglického internal transcribed spacer)
kalcein AM	derivát kalceinu acetomethoxy
LAMP-1	protein asociovaný s membránami lysozomů (Lysosomal-associated membrane protein 1)
LB médium	médium pro bakteriální kultury (z anglického Luria-Bertani Medium)
LP filtr	Long Pass filtr – nepropouští kratší vlnové délky, než je uvedeno
M $\beta$ CD	methyl- $\beta$ -cyklodextrin
MCT	detektor Mercury-Cadmium Tellurid
MFF UK	Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy
NMR	nukleární magnetická rezonance
NPC	Niemann-Pickova choroba typu C
NPC1	protein Niemann-Pick type C1
NPC2	protein Niemann-Pick type C2
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI	propidium jodid
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
RNA	ribonukleová kyselina
RPMI médium	médium pro tkáňové kultury (z angl. Roswell Park Memorial Institute Medium)
SDS	sodium dodecyl sulfát
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SSC	side scatter
SSU	malá podjednotka ribosomu
TBE	pufr tris-borát-EDTA
TBS	pufr tris buffered saline
TK voda	deionizovaná voda pro tkáňové kultury
TSB médium	médium pro bakteriální kultury (z anglického Tryptic Soy Broth Medium)



Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid
YPAD	médium pro kvasinkové kultury (z anglického Yeast Extract-Peptone-Adenine-Dextrose Medium)
UV	ultrafialové záření

# 1 Úvod

V poslední době nastává renesance zájmu o bioaktivní látky, izolované z nejrůznějších typů organismů. Účinné látky jsou pak v mnoha případech dále optimalizovány pomocí chemických modifikací. Důvod, proč se v dnešní době stále více chemiků a biologů vrací ke studiu sekundárních metabolitů, je, že tyto látky byly přírodním výběrem optimalizovány často po mnoho milionů let pro svou selektivní biologickou aktivitu z hlediska interakce s konkrétními organismy. Ve farmaceutickém průmyslu bylo do dnešní doby syntetizováno několik milionů nových organických chemických struktur, pouze nepatrná část (asi 0,001 %) z nich se však uplatnila v praxi. Naproti tomu uplatnění našlo asi 0,2–0,3 % látek izolovaných přímo z mikrobiálních kultur (Bérdy, 2005).

Sekundární metabolity jsou látky produkované mnoha organismy, jimž poskytují určité výhody v boji proti konkurentům, predátorům nebo parazitům. Jednotlivé sekundární metabolity jsou typické pro určité skupiny organismů, které takové metabolity produkují. Jednou z těchto skupin jsou i bakterie rodu *Streptomyces* (Actinobacteria: *Actinomycetales*). Jsou to aerobní půdní vláknité bakterie pozitivní na Gramovo barvení, které žijí ve velmi kompetitivních společenstvech. Mnoho z nich produkuje celou řadu biologicky aktivních látek, přičemž asi dvě třetiny všech známých antibiotik jsou součástí jejich sekundárního metabolismu, včetně řady makrolidů. Těch bylo do dnešní doby identifikováno přes 200. Mnohé jsou dnes využívány ve farmaceutickém průmyslu jako účinná antibiotika (např. erythromycin A) nebo imunosupresiva (rapamycin), jiné se velmi dobře uplatňují v biologickém výzkumu. Vedle antibiotik produkují streptomycety také mnoho protinádorových látek (např. doxorubicin). Díky své diverzitě stále představují streptomycety nedostatečně probádanou studnici nových látek s potenciálně zajímavou biologickou aktivitou. V nedávné době byly objeveny nové streptomycety, které produkují řadu doposud nepopsaných perspektivních molekul s bioaktivními účinky. Jednou z nich je i *Streptomyces durmitorensis* nalezený ve vzorcích půdy národního parku Durmitor v Černé Hoře, který produkuje sekundární metabolit, jimž se zabývá tato diplomová práce. Vzhledem k tomu, že počáteční podrobná charakteristika nově izolovaných látek je zásadní pro cílení jejich dalšího

výzkumu vedoucí k případnému využití v praxi, byla v této práci provedena základní charakteristika bioaktivní látky izolované ze *Streptomyces durmitorensis* s nastíněním její možné aplikace ve výzkumu nebo diagnostice.

## 1.1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je charakterizovat nově izolovaný sekundární metabolit produkovaný aktinomycetou *Streptomyces durmitorensis* po stránce fluorescenčních vlastností i bioaktivit. Na základě pilotních studií bylo zjištěno, že tento metabolit má poměrně unikátní chování ve srovnání s dalšími podobnými molekulami s možností využití v praxi včetně lékařské diagnostiky. U každé takové látky je však potřeba prostudovat její vlastnosti a chování jako základ pro další výzkum. Závěry této práce by mohly napomoci vývoji nové membránové fluorescenční sondy nebo dalšího antibiotika makrolidové řady.

Cíle této diplomové práce jsou:

- charakterizovat spektrální fluorescenční vlastnosti nově izolovaného metabolitu
- charakterizovat jeho biologické aktivity na různých buněčných typech
- objasnit mechanismus jeho inkorporace do biologických membrán
- nastínit možné budoucí využití v praxi

## 2 Literární přehled

### 2.1 Sekundární metabolity

Sekundární metabolity jsou organické látky, které nejsou nezbytné pro přežití organismu, ale zajišťují mu určitou výhodu v boji se svými konkurenty, predátory nebo parazity. Nedostatek sekundárních metabolitů nevede na rozdíl od nedostatku primárních metabolitů k okamžité smrti organismu (popřípadě k omezení viability), může pouze snížit jeho konkurenceschopnost nebo odolnost vůči vnějšímu prostředí. Produkce konkrétního typu sekundárních metabolitů je často charakteristická pro celou fylogenetickou skupinu.

K sekundárním metabolitům patří rostlinné alkaloidy - například kokain (produkovaný *Erythroxylon coca*) nebo atropin (*Atropa belladonna*), terpeny - například artemisinin (*Artemisia annua*), glykosidy - například aglykon (*Liliacea*) a mnoho dalších. Mezi živočišnými sekundárními metabolity lze jmenovat tetrodotoxin ze čtverzubců rodu *Takifugu*. Mnoho z těchto látek využívá farmaceutický průmysl jako účinná léčiva zahrnující antibakteriální látky, antimykotika, protinádorová léčiva nebo imunosupresiva.

Významnými producenty sekundárních metabolitů jsou bakterie rodu *Streptomyces*. Produkují asi 70 % všech doposud známých antibiotik. Jako příklady lze jmenovat erythromycin extrahovaný ze *Streptomyces erythreus*, streptomycin ze *Streptomyces griseus* nebo chloramfenikol ze *Streptomyces venezualae*. Vedle antibiotik produkují některé streptomycety i látky brzdící růst nádorů jakým je například doxorubicin (*Streptomyces peucetius*). Sekundární metabolity streptomycet nenachází uplatnění pouze v medicíně, ale některé jsou využívány i ve výzkumu například jako fluorescenční molekuly vhodné pro detekci buněčného cholesterolu díky své specifické vazbě na tento sterol (například filipin izolovaný ze *Streptomyces filipinensis*).

Sekundární metabolity jsou využitelné i v agropřůmyslu jako látky podporující růst rostlin či jejich ochranu před škůdci, ale i jako účinné herbicidy. Příkladem může být oligomycin A (*Streptomyces diastatochromogenes*) využívaný jako účinný fungicid,

který na rozdíl od syntetických fungicidů neovlivňuje půdní mikroflóru (Compant et al., 2005).

Za objev prvního antibiotika původem ze streptomycet – streptomycinu (*Streptomyces griseus*) – byla v roce 1952 udělena Selmanu Waksmanovi Nobelova cena.

## 2.2 Bakterie rodu *Streptomyces*

První zástupce aktinomycet – *Actinomyces griseus* (kmen DSM 40236) - byl izolován Krainskim v roce 1914 z půdních vzorků v Rusku (Krainsky, 1914). V roce 1916 byl izolován Waksmanen a Curtisem podobný druh také v Americe (Waksman & Curtis, 1916). Zjistilo se, že se tyto mikroorganismy mezi sebou liší v řadě důležitých vlastností (tvorba spor atd.). V důsledku toho bylo v roce 1943 Waksmanem a Henricim navrženo rozdělení skupiny aktinomycet a ustanovení samostatného rodu *Streptomyces*, který by zahrnoval bakterie tvořící sporulující vzdušná myselia (Waksman & Henrici, 1943).

Bakterie rodu *Streptomyces* představují největší rod třídy *Actinobacteria* a tvoří jednu z nejkompexnějších skupin bakterií. V dnešní době je popsáno téměř 600 druhů (Euzéby, 2012). Jedná se o obligátně aerobní vláknité bakterie, které svou filamentární strukturou vzhledově připomínají houby. Na rozdíl od nich se ale jedná o prokaryota, tedy o organismy s cirkulární DNA bez vnitrobuněčných membránových organel, nikoliv o eukaryota, jak je tomu u hub. Reagují pozitivně na Gramovo barvení, a to díky přítomnosti peptidoglykanové buněčné stěny na svém povrchu a absencí lipopolysacharidové vrstvy. Dalšími typickými vlastnostmi jsou vysoký obsah cytosinu a guaninu v DNA (nad 55 %) a buněčná stěna chemotypu I (obsah LL-diaminopimelové kyseliny s glycinem v peptidoglykanu buněčné stěny) (Becker, 1965). Ve fylogenetických stromech založených na SSU rDNA tvoří streptomycety monofyletickou skupinu.

Streptomycety tvoří významnou složku půdní mikroflóry. Více než 95 % filamentárních půdních aktinomycet spadá právě do rodu *Streptomyces* (Elander, 1987). Podílí se zde na rozkladu organického materiálu a návratu živin z odumřelých organických zbytků zpět do půdy, přičemž k degradaci organické hmoty využívají hlavně extracelulární enzymy. Streptomycety byly nalezeny také v mořích i sladkých vodách. V tomto

případě se však zřejmě nejedná o jejich autochtonní rozšíření. Díky své nenáročnosti na živiny a vitamíny i díky tvorbě snadno šířitelných spor jsou velmi úspěšné při osidlování nových půdních biotopů.

Životní cyklus streptomycet je podobný životnímu cyklu hub (Obr. 1). Na rozdíl od nich však streptomycety postrádají pohlavní rozmnožování. Tvoří dva typy mycelií a spor. Primární (vegetativní) mycelium je tvořeno především v exponenciálním růstu, hyfy jsou rozvětvené, mnohojaderné a vytváří myceliální síť. Mycelium je také charakteristické produkcí antibiotik a barevných pigmentů. Tyto metabolity mohou být vylučovány do média jako exopigmenty nebo se mohou vázat na některé buněčné struktury a způsobovat typické zabarvení kolonií. Produkce antibiotik je spřažena s mechanismy, které chrání buňky samotného producenta před toxickým vlivem jím produkovaného metabolitu (zabalení do vezikulárních kompartmentů, specifické transportní systémy atd.). Geny pro rezistenci se často nachází v lokusech pro biosyntézu samotného sekundárního metabolitu (Janssen & Bibb, 1990) (Hopwood, 2007). Vegetativní mycelium je později v rámci životního cyklu nahrazováno sekundárním (vzdušným) myceliem. V mnohojaderných filamentech se tvoří množství dvouvrstevných tenkých sporulačních sept, mezi nimiž vznikají jednojaderné spory (Chater & Chandra, 2006) nazývané konidie nebo arthrospory. Pomocí spor se streptomycety rozmnožují, osidlují nové biotopy a přežívají nepříznivé podmínky. U většiny streptomycet je tato přeměna mycelia podmíněna dostatkem živin a nasyntetizovaných buněčných komponent. Některé druhy, například *Streptomyces griseus*, jsou však schopné tvořit spory i v minimálním médiu s nedostatkem živin (Kendrick & Ensign, 1983). Po sporulaci sekundární mycelium zaniká (Miguélez et al., 1999). Tvorba spor zajišťuje streptomycetám přežívání nepříznivých podmínek prostředí, obecně se však dá konstatovat, že spory streptomycet nejsou tak teplotně odolné jako spory jiných bakterií (Chater & Chandra, 2006).



**Obr. 1: Životní cyklus streptomycet.**

(Jim Hunter 2007) (upraveno podle <http://openwetware.org>).

Morfologie streptomycet se může u jednotlivých kolonií lišit. Důvodem je genetická nestabilita a časté spontánní mutace. Tento jev je nejspíše vysvětlitelný velkým množstvím duplikovaných sekvencí v cirkulárním chromozomu, které vznikají rekombinací mezi chromozomy uvnitř mnohojaderných buněk vzdušných mycelií (Cullum et al., 1988).

### 2.2.1 *Streptomyces durmitorensis*

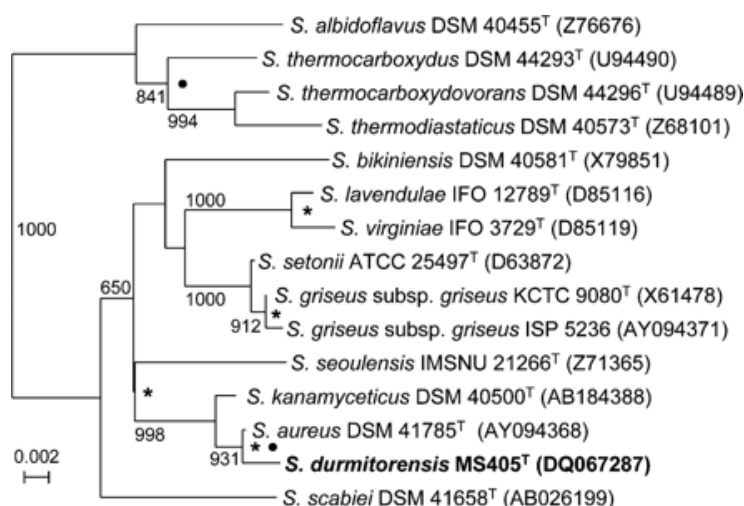
Testování půdních vzorků v roce 2007 v národním parku Durmitor (Černá Hora) zaměřené na identifikaci nových bakteriálních rodů produkujících imunosupresiva s podobným mechanismem účinku jako má látka FK506 – takrolimus (inhibice

kalcineurinu v T-lymfocytech, jejímž důsledkem je inhibice transkripce a produkce interleukinu IL-2) (Skoko et al., 2005) vedlo k objevu nového druhu aktinomycet MS405<sup>T</sup> (= DSM 41863), který byl podle morfologie a molekulárních znaků zařazen do rodu *Streptomyces*. Produkce látky podobné FK506 byla testována na kvasinkách kmene *Saccharomyces cerevisiae* FAV 20, který byl cíleně vyvinut právě pro testování produkce FK506 aktinomycetami (Skoko et al., 2005). Tento kmen je na rozdíl od běžných laboratorních kmenů senzitivní na FK506 díky cíleným mutacím v genu VMA22 (VPH6), který je nezbytný pro správnou funkci V-ATPázy (Preston et al., 1992). Ukázalo se, že pro viabilitu kvasinek s mutovanou V-ATPázou je nezbytná správná funkce kalcineurinu. Jeho inhibice imunosupresivem FK506 je tedy pro mutantní kvasinky letální (Tanida et al., 1995).

Tým Savice použil k zařazení nově objevené streptomycety do fylogenetického stromu sekvenaci genu pro 16S rRNA. Genová sekvence pro 16S rRNA je evolučně velmi konzervovaná a používá se při fylogenetických studiích pro určení příbuznosti jednotlivých skupin bakterií (Stackebrandt et al., 1997). Při analýzách fylogeneze založených na sekvenaci tohoto genu je však potřeba postupovat velmi obezřetně (Martínez-Murcia et al., 1999). Zařazení fylogeneticky velmi příbuzných druhů podle této metody může být problematické právě díky značné evoluční konzervovanosti tohoto genu. Pomocí sekvenace genu pro 16S rRNA byla tedy prokázána vysoká příbuznost druhu MS405<sup>T</sup> se *Streptomyces aureus* DSM 41785<sup>T</sup> (99,59 %), ale také se *Streptomyces kanamyceticus* DSM 40500<sup>T</sup> (99,32 %) (Obr. 2). Sekvenace 16S – 23S ITS (spojovací genomová sekvence mezi geny pro 16S a 23S rRNA) ovšem ukázala, že MS405<sup>T</sup> je blízce příbuzný *Streptomyces scabiei* (klon 79). Samotní autoři ale přiznávají, že sekvenace ITS u aktinobakterií není vhodnou sekvencí pro fylogenetické analýzy. Pro přesné zařazení druhu do fylogenetického stromu se přistoupilo k analýze příbuznosti DNA podle metody De Leye et al. (1970) s modifikacemi podle Huß et al. (1983) se *Streptomyces aureus* DSM 41785<sup>T</sup> a *Streptomyces kanamyceticus* DSM 40500<sup>T</sup>. Cílem bylo jednoznačně odlišit MS405<sup>T</sup> od těchto druhů. Na základě hybridizace DNA byly určeny míry příbuznosti s výše uvedenými dvěma druhy. Se *Streptomyces aureus* je MS405<sup>T</sup> podle této metody příbuzný z 15,5 % a se *Streptomyces kanamyceticus* z 13,3% (Savic et al., 2007). Naměřené hodnoty jsou hluboko pod 70 %, což je hranice stanovená pro určení nového druhu (Wayne et al., 1987). Tyto výsledky tedy potvrdily objev nového druhu streptomycet, který byl následně pojmenován podle lokality svého objevu – *Streptomyces durmitorensis* (Savic et al., 2007). V dalších



analýzách byl u izolované bakterie zjištěn 72% molární obsah guaninu a cytosinu v DNA a potvrzena přítomnost diaminopimelové kyseliny (DAP) v buněčné stěně – tedy chemotyp I (Savic et al., 2007), což jen potvrzuje správné zařazení druhu do skupiny streptomycet.



**Obr. 2:** Část fylogenetického stromu pro bakterie *Streptomyces* sestavený na základě sekvencí pro gen 16S rRNA.

Znáznorňuje vztah *Streptomyces durmitorensis* a jemu příbuzných druhů streptomycet (upraveno podle Savic et al., 2007).

Z této nově popsané streptomycety byl v laboratoři RNDr. Miroslava Fliegra, CSc. na Mikrobiologickém ústavu AV ČR izolován sekundární metabolit velmi podobný makrolidovému antibiotiku roflamykoinu (viz dále).

## 2.3 Makrolidy

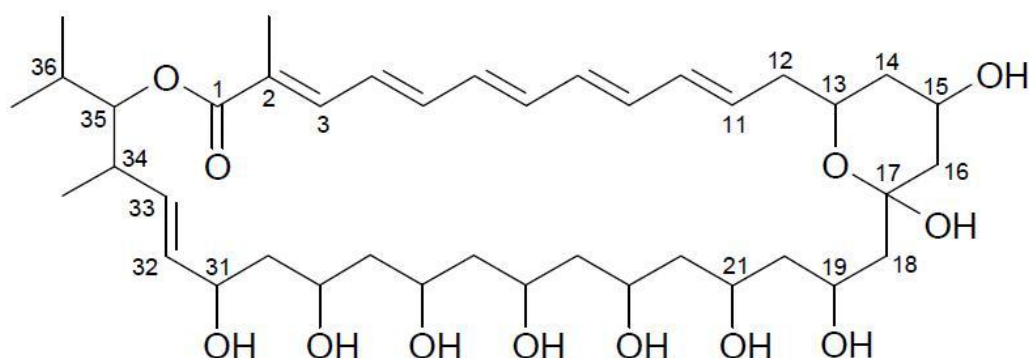
Skupina makrolidů dostala svůj název v roce 1957 z podnětu Woodwarda po izolaci dvou strukturně si podobných molekul odlišujících se od ostatních antibiotik – erythromycinu ze *Streptomyces erythreus* a spiramycinu ze *Streptomyces ambofaciens*, které měly ve své struktuře typickou strukturu laktonového kruhu (Woodward, 1957).

Makrolidy náleží do velké skupiny polyketidů. Jsou to vesměs látky izolované z přírodních zdrojů, kterých bylo do dnešní doby popsáno přes 10 000. Nejvýznamnější podskupinu polyketidů tvoří polyenová makrolidová antibiotika, kterých bylo od roku 1950 identifikováno přes 200. Polyenové makrolidy jsou velké (makros = velký) nenasyčené uhlovodíky charakteristické svou strukturou – „makrolidovým kruhem“ – a amfipatickým charakterem. Obsahují laktonový kruh s více než 23 atomy, 3–8 konjugovanými dvojnými vazbami a alkylovými, hydroxylovými, aldehydovými nebo ketonovými skupinami. Konjugované vazby mezi sebou interagují za vzniku rezonanční struktury, která udává molekule celkově nižší potenciální energii a větší stabilitu. Podle počtu konjugovaných dvojných vazeb jsou makrolidy označovány jako trieny, tetraeny, pentaeny, hexaeny, heptaeny nebo oktaeny. Někdy je na makrolidovém kruhu navázán jeden nebo více deoxy cukrů.

Většina makrolidů je produkována půdními aktinomycetami. Některé z nich se uplatnily v klinické praxi jako účinná antibiotika. Příkladem může být nystatin (*Streptomyces noursei*), amfotericin B (*Streptomyces nodosus*), pimaricin (*Streptomyces natalensis*) nebo candicidin D (*Streptomyces acrimycini*) (oddíl 2.3.2, Obr. 4).

### 2.3.1 Makrolid produkováný bakterií *Streptomyces durmitorensis*

Makrolid, který byl jako jedna z frakcí izolovaný ze *Streptomyces durmitorensis* ve formě žlutého prášku, je rozpustný v methanolu, ethanolu, acetonu a DMSO, ale nerozpustný ve vodě. Jedná se o fluorescenční molekulu. Pomocí hmotnostní spektrometrie byla zjištěna skladba atomů  $C_{40} H_{64} O_{12}$  s relativní molekulovou hmotností 736,4. Struktura metabolitu byla popsána pomocí NMR a FTMS spektrometrie jako 32,33-didehydroroflamykoin (DDHR) (Obr. 3) (Stodůlková et al., 2011).



**Obr. 3: Struktura 32,33-didehydroroflomykoinu.**

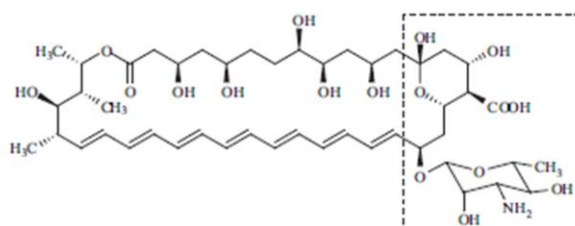
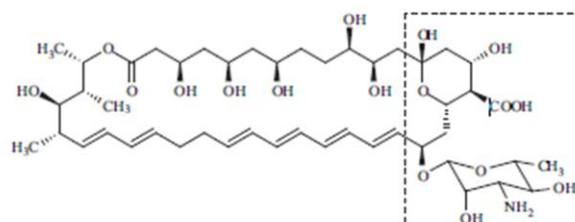
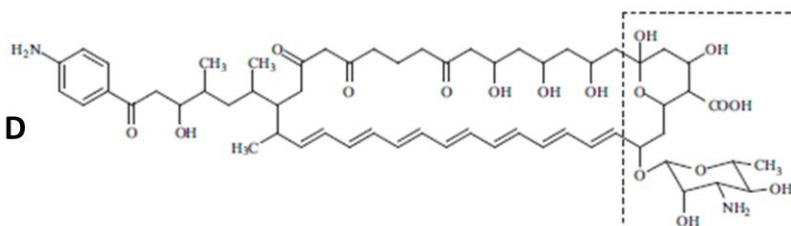
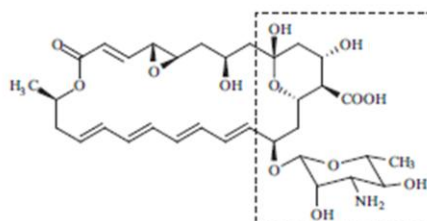
Struktura této molekuly byla zjištěna pomocí NMR a FTMS spektrometrie (Stodůlková et al., 2011).

Strukturně se tato molekula velmi podobá molekule roflamykoinu. Roflamykoin je makrolidové antibiotikum (pentaen), původně zvaný flavomykoin, který byl izolován z bakteriální kultury *Streptomyces roseoflavus* (DSM 40536) (Schlegel et al, 1971) nebo *Streptomyces maghwi* (Afzal et al., 1983). Podobně jako DDHR je i roflamykoin fluorescenční molekulou a ve své krystalické formě má také podobu žlutého prášku (Afzal et al., 1983). Jeho planární struktura byla popsána Schlegelem v roce 1981 (Schlegel et al., 1981), přesná struktura však byla zjištěna až vědeckou skupinou Rychnovského (Rychnovsky et al., 1995). Roflamykoin se liší od DDHR absencí dvojné vazby mezi uhlíky č. 32 a 33. Byla u něj prokázána schopnost indukovat tvorbu kanálů v buněčných membránách (Grigorjev & Bezrukov, 1994). Podobná aktivita byla zjištěna i u makrolidů nystatinu nebo amfotericinu B (Bolard, 1986).

### 2.3.2 Využití makrolidů v medicíně

Některá polyenová antibiotika mají unikátní fungicidní vlastnosti, díky nimž se část z nich prosadila v medicíně. Hlavním mechanismem antibiotického a fungicidního působení některých známých polyenových makrolidů je schopnost permeabilizovat membrány tvorbou kanálů interakcí s membránovými steroly a umožnit tak průnik iontů (Bolard, 1986). Klíčem k mechanismu jejich účinku je jejich molekulová struktura. Konjugované dvojné vazby tvoří hydrofobní oblast molekuly, na protější straně jsou pak polární skupiny jako karbonylové, epoxidové nebo hydroxylové skupiny. U takové

molekulové struktury lze očekávat interakce s jinými biologickými molekulami a zároveň antibiotické účinky založené na tvorbě kanálů v membránách. V medicíně se využívají zejména glykosylované polyeny, u kterých je na rozdíl od neglykosylovaných forem prokazatelně lepší poměr mezi jejich antibiotickým působením a toxicitou pro savčí buňky (Zotchev, 2003).

**Amphotericin B****Nystatin A1****Candididin D****Pimaricin**

**Obr. 4: Chemické struktury glykosylovaných makrolidů amfotericinu B, nystatinu A, candidinu D a pimaricinu, které jsou v současné době využívány v medicíně jako antibiotika.**

Konzervovaná část molekul zahrnující hemiketalovou a ionizovatelnou skupinu je vyznačena v rámečku (Upraveno podle Zotchev, 2003).

Za zmínku stojí především dvě makrolidové struktury, u nichž byl prokázán antibiotický efekt, schopnost vazby na membránový cholesterol a schopnost fluorescence – nystatin (tetraen) a amfotericin B (heptaen) (Obr. 4). Díky těmto vlastnostem se jejich glykosylované formy prosadily nejen v medicíně, ale částečně i ve výzkumu. Jak nystatin, tak amfotericin B jsou schopny indukovat tvorbu kanálů

v buněčných membránách pouze za současného obsahu cholesterolu/ergosterolu. Díky tomu jsou někdy využívány jako cholesterolové sondy, v medicíně jsou již více než 40 let řazeny mezi jedny z nejefektivnějších antifungicidů. Právě vyšší afinita těchto látek k ergosterolu, který reprezentuje hlavní membránový sterol v membránách hub, než k cholesterolu, obsaženému v membránách savčích buněk, je základem jejich užití v medicíně (Teerlink et al., 1980).

V dnešní době jsou objevovány stále nové makrolidy produkované streptomycetami. Příkladem může být neaumycin produkovaný aktinomycetou *Streptomyces sp.* NEAU-x211, nalezenou ve středním Mongolsku (Huang et al., 2012), u kterého je jeho bioaktivita nyní otázkou výzkumu. Zároveň se metodami chemické kombinatoriky vycházející ze známých účinných makrolidů hledají nové molekuly, které by vykazovaly nižší toxicitu vůči savčím buňkám a zároveň neztratily svoji účinnost vůči patogenům (Baginski & Czub, 2009). Bylo vyvinuto několik analogů amfotericinu B, u nichž byl prokázán *in vitro* výrazně nižší cytotoxický efekt (Soler et al., 2008) (Caffrey et al., 2008). Také v případě nystatinu jsou prováděny chemické modifikace, které by mohly vést k vyšším antifungicidním aktivitám a zároveň k nižším cytotoxickým efektům na savčí buňky (Brautaset et al., 2008). Chemickými modifikacemi s takovým efektem jsou také již zmíněné glykosylace.

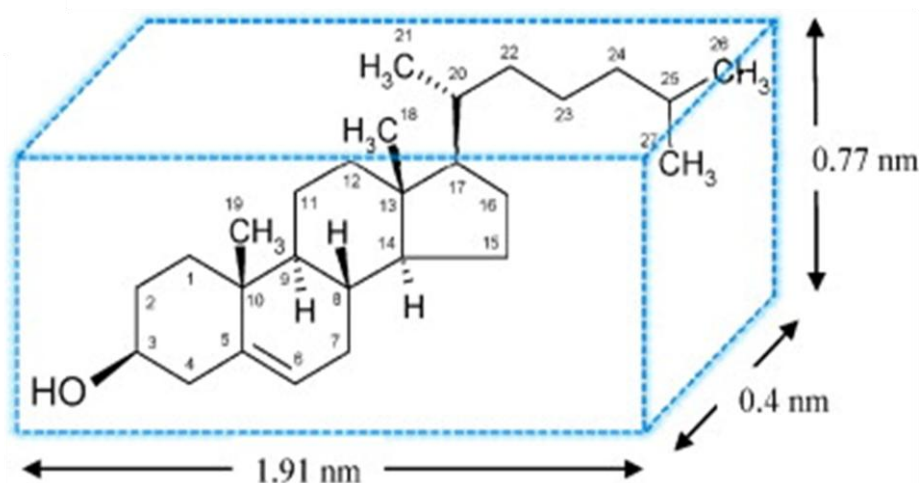
Obecně je většina těchto molekul silně fungicidních a vykazuje vysokou toxicitu vůči savčím buňkám, zvláště vůči buňkám ledvin, které jsou k hemolytickému působení makrolidů velmi citlivé. Dlouhodobá aplikace makrolidových antibiotik může vyústit až v selhání ledvin, hypoglykémii nebo flebotrombózu (Bérdy, 2005). Přes všechny tyto komplikace jsou makrolidy v medicíně ve středu zájmu i díky velmi nízké četnosti vzniku rezistence na ně u významných patogenů.

## 2.4 Steroly

Některé makrolidy jsou charakteristické schopností interagovat se steroly. Mezi takové molekuly patří například polyen filipin (Bittman & Frischkoff, 1972), který je strukturně podobný DDHR (Obr. 3, oddíl 2.3.1) a díky svým fluorescenčním vlastnostem se využívá jako detekční sonda pro cholesterol. Je tedy možné předpokládat, že DDHR bude podobně jako filipin také interagovat se steroly.

## 2.4.1 Cholesterol

Cholesterol je lipid, který u většiny eukaryotních buněk tvoří významnou a nezbytnou složku plasmatické membrány i některých membrán intracelulárních. Jeho rigidní planární struktura (Obr. 5) vyplňuje prostor mezi fosfolipidy v membránové dvojvrstvě, díky čemuž významně ovlivňuje mnoho vlastností membrány, jako je její tloušťka, fluidita a laterální rigidita (Silvius, 2003). Dále také ovlivňuje aktivitu a lokalizaci mnoha proteinů interagujících s membránami, pro některé proteiny je přítomnost cholesterolu nezbytná. Cholesterol je také prekurzorem pro syntézu steroidních hormonů, žlučových kyselin a vitamínu D. Cholesterol je nerozpustný ve vodě, avšak jeho jediná hydroxylová skupina mu dodává amfipatický charakter, díky čemuž může být efektivně začleněn do buněčných membrán.



**Obr. 5:** Struktura molekuly cholesterolu a její rozměry (Gimpl & Gehrig-Burger, 2011).

Cholesterol se v buňkách vyskytuje ve dvou formách: neesterifikovaný, který je označován i jako volný cholesterol, vyskytující se v membránách, a hydrofobní esterifikovaný, který je v buňce ukládán ve formě tukových kapének. V cirkulaci je cholesterol transportován ve formě komplexů s lipoproteiny, jejichž matrix je tvořena právě esterifikovanými molekulami cholesterolu. Cholesterol v membránách interaguje se sfingolipidy, fosfatidylcholinu a fosfatidylserinu (Steck et al., 2010). Přednostně interaguje s fosfolipidy s navázanými dlouhými nasycenými mastnými kyselinami.

Obsah cholesterolu není v membránách jednotlivých organel stejný. Nejvyšší koncentrace cholesterolu v savčích buňkách byla nalezena v plasmatické membráně, kde tvoří 30–50 % celkového počtu lipidů. Endoplasmatické retikulum je intracelulární membránová struktura poměrně chudá na obsah cholesterolu. Ačkoliv je právě zde tento sterol syntetizován, tvoří za normálních podmínek pouze asi 0,5–1 % z celkového počtu membránových lipidů (Lange et al., 1999). Velmi nízký obsah cholesterolu je také v mitochondriích, vnitřní mitochondriální membrány neobsahují žádný cholesterol (Colbeau et al., 1971).

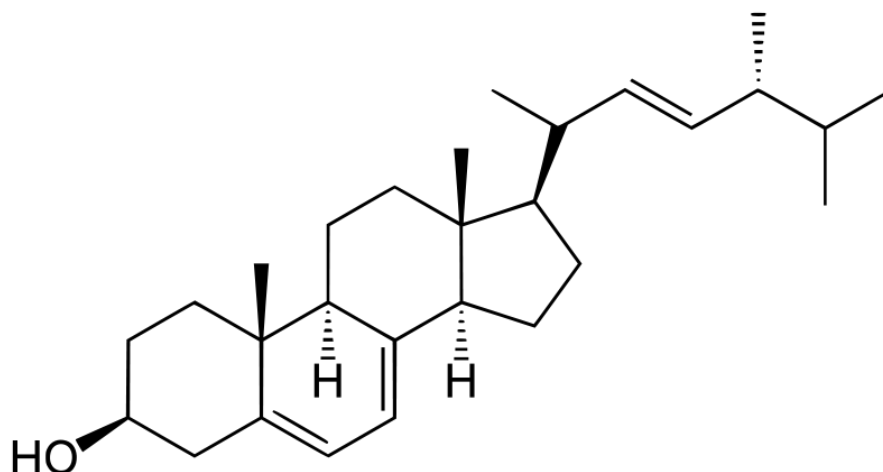
Během studií na umělých membránách s lipidovým složením podobným, jaké je v plasmatické membráně, bylo zjištěno, že cholesterol není distribuován v membránách náhodně, ale jeho obsah se zvyšuje v určitých mikrooblastech. Ovlivňuje tak mimo jiné i laterální organizaci membrán. Mnohé studie provedené přímo na buněčných membránách tyto výsledky potvrdily (některé studie ale tyto výsledky naopak zpochybňují). Z prostorově nerovnoměrného uspořádání cholesterolu v membránách někteří autoři vyvodili existenci membránových mikrodomén – tzv. lipidových raftů. Tyto strukturně odlišné oblasti mohou podle nich hrát roli v buněčných signalizacích nebo příjmu látek z extracelulárního prostoru buňky (Ikonen, 2001).

Intracelulární transport cholesterolu je zajišťován vezikulární a nevezikulární cestou. Nevezikulární cesta je zprostředkována proteinovými přenašeči, kontaktem membrán nebo jejich kombinací. Transportními proteiny sterolů jsou povětšinou ty, které obsahují START doménu. Tyto proteiny lze nalézt v jádře, cytosolických membránových kompartmentech i v cytosolu. START doména je složená z asi 210 aminokyselin, které tvoří hydrofobní tunel ideální pro vazbu sterolových molekul (Strauss et al., 2003). V případě vezikulárního transportu je cholesterol v komplexu s lipoproteiny nejprve endocytován do endozomů, v lysozomech je pak transportní lipoprotein degradován a volný cholesterol je transportován do endoplasmatického retikula. Transport z lysozomů zprostředkovávají proteiny Niemann-Pick type C1 (NPC1) a Niemann-Pick type C2 (NPC2) (Ikonen & Jansen, 2008).

Nadměrná akumulace volného cholesterolu v buňkách může být toxická, z toho důvodu je buňka přeměňuje na cholesterylestery (Tabas, 2002), které jsou společně s jinými lipidy uchovávány ve formě tukových kapének, pro které je charakteristická pouze jednovrstevná lipidová membrána.

## 2.4.2 Ergosterol

Ergosterol má velmi podobnou strukturu jako cholesterol, liší se od něj pouze přítomností dvou dvojných vazeb ve sterolovém kruhu (Obr. 6). Ergosterol se vyskytuje především v cytoplasmatické membráně nižších i vyšších hub a kvasinek, kde plní podobné funkce jako cholesterol u ostatních eukaryot.



Obr. 6: Struktura molekuly ergosterolu (převzato z <http://en.wikipedia.org/wiki/Ergosterol>).

Některá makrolidová antibiotika mají schopnost vázat se nejen na cholesterol, ale i na ergosterol, ke kterému mají často vyšší afinitu než k cholesterolu. To je základem jejich silného antifungicidního účinku. Právě vyšší afinita makrolidů k ergosterolu než k cholesterolu, který je obsažen v membránách savčích buněk, a tedy vyšší toxicita pro buňky hub než pro savčí buňky, je základem využití makrolidů v medicíně jako antibiotik (Teerlink et al., 1980).

## 2.4.3 Hopanoidy

V membránách prokaryotických buněk se steroly většinou nenachází. Jejich funkci plní hopanoidy, což jsou podobně jako steroly planární molekuly (Rohmer et al., 1979). Pokud se cholesterol v membránách prokaryotických buněk vyskytuje, jedná se ve většině případů o molekuly vyrobené hostitelskou eukaryotickou buňkou a „zcizené“ hostiteli při parazitaci, jak je tomu v případě bakterií rodu *Mycoplasma* (Dahl et al., 1982). Některé methylotrófní bakterie mají vlastní biosynetickou dráhu k produkci



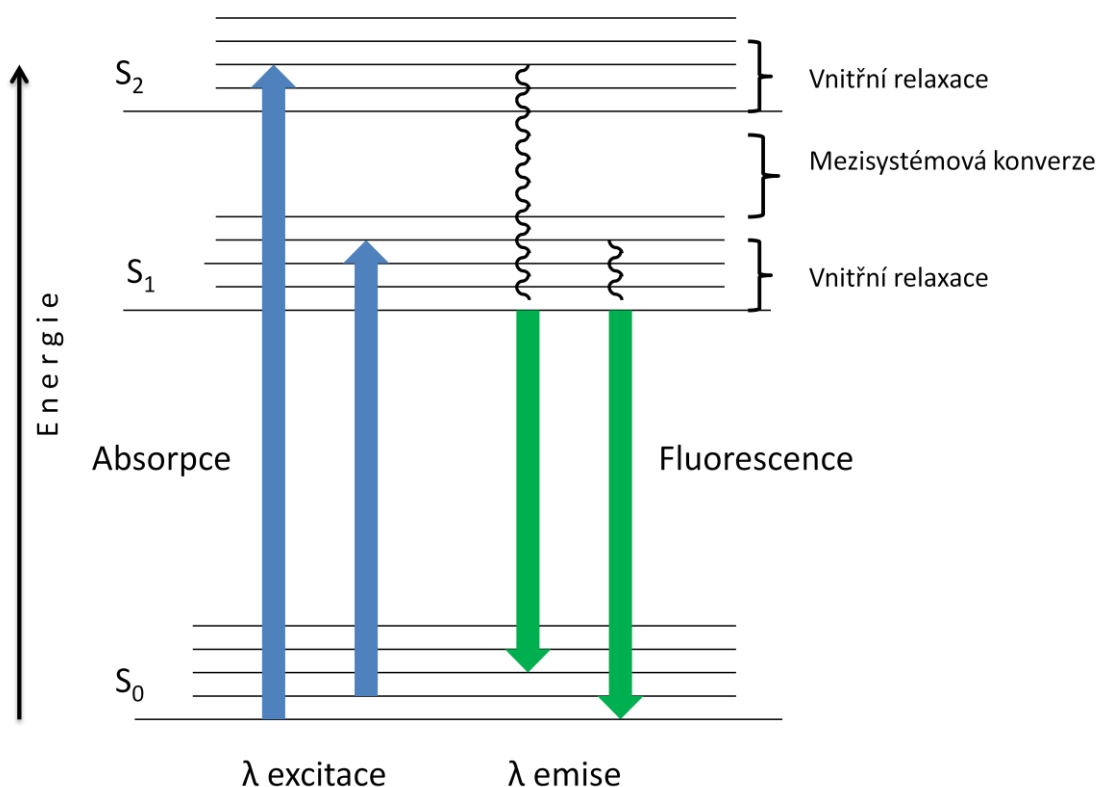
sterolů (Bouvier et al., 1976) (Schouten et al., 2000). Vzhledem k tomu, že neexistují evoluční spojitosti s producenty cholesterolu, došlo pravděpodobně k horizontálnímu přenosu genetické informace pro metabolickou dráhu biosyntézy sterolů do těchto bakterií od eukaryot.

## 2.5 Fluorescenční spektroskopie

### 2.5.1 Fluorescence

Makrolid 32,33-didehydroroflomykoin je fluorescenční molekulou. Jeho fluorescenci zajišťují konjugované dvojné vazby v hydrofobní části molekuly.

Fluorescence je schopnost některých látek (fluoroforů) emitovat fotony určité vlnové délky téměř okamžitě poté, co byla excitována fotony jiné (většinou kratší) vlnové délky. K absorpci fotonu dochází pouze při excitaci látky světlem určité vlnové délky (Obr. 7). Pokud má absorbovaný foton více energie, než je potřeba pro přechod mezi elektronovými stavy, nadbytek energie je většinou převeden na rotační a vibrační energii molekuly a vyzářen ve formě tepla. Většina molekul nemá za normálních teplot dostatečnou vnitřní energii pro přechod do jiného elektronového stavu, zůstává na nejnižší vibrační hladině základního stavu  $S_0$ . Po absorpci záření vhodné vlnové délky dochází k excitaci do excitovaných singletních stavů  $S_1$  nebo  $S_2$ . Přechod mezi stavy  $S_2$  a  $S_1$  a rovnovážnou vibrační hladinou  $S_1$  se děje vnitřní konverzí (přechod  $S_2$  do  $S_1$ ) nebo vibrační relaxací na rovnovážnou hladinu excitovaného  $S_1$  stavu. Foton je vyzářen při zářivém přechodu elektronů právě z této rovnovážné hladiny excitovaného stavu  $S_1$  do základního stavu  $S_0$  bez změny spinu. Ve stavu  $S_1$  setrvá molekula před přechodem do stavu  $S_0$  nejvýše několik nanosekund, proto je foton na rozdíl od fosforescence vyzářen téměř okamžitě po absorpci vhodného záření. Jelikož je energie vyzářená při fluorescenci díky neradiačním přechodům menší než energie absorbovaná, je fluorescenční spektrum posunuto do vyšších vlnových délek (Stokesův posuv).



**Obr. 7: Zjednodušený Jablonskiho diagram.**

Po excitaci vhodnou vlnovou délkou dochází k absorpci a molekula přechází ze základního elektronového stavu do excitovaného elektronového stavu. Část absorbované energie je vyzářena ve formě tepla (znázorněno vlnkou), zbytek energie je vyzářen ve formě fotonu určité vlnové délky a molekula přejde do základního elektronového stavu.

## 2.5.2 Využití fluorescence

Fluorescenční metody jsou stále více využívány v biomedicíně, biofyzice, genetických analýzách ale i v mnoha jiných oborech. Fluorescenční látky, které se využívají pro fluorescenční detekci, lze rozdělit do dvou skupin: fluorescenční sondy s vlastní fluorescencí, které přímo samy o sobě slouží jako specifické detekční nástroje, a fluorescenční značky, které je třeba kovalentně ke studované substanci navázat. Fluorescenční sondy mění po nekovalentní vazbě na studovanou molekulu svoje vlastnosti (intenzitu fluorescence, hodnotu emisního maxima atp.).

Fluorescenční sondy jsou díky své specifičnosti a snadné detekovatelnosti využitelné v mnoha oborech, například při určování množství, struktury, funkce a lokalizace různých molekul. Existuje několik typů fluorescenčních sond využívaných

v biologickém výzkumu, které můžeme podle vlastností rozdělit do těchto skupin: sondy pro studium lokalizace studovaných molekul, sondy vhodné pro studium přenosu energie (měření vzdáleností určitých fluorescenčně značených struktur), pro studium polarity prostředí, membránové sondy (studium transportu a metabolismu lipidů), rigidity membrán, sondy určené ke studiu membránového potenciálu a sondy pro DNA a RNA. Dále jsou také fluorescenční sondy využívány k měření koncentrace některých látek.

### 2.5.3 Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence je proces, při kterém dochází k poklesu intenzity fluorescence. Základními typy zhášení jsou dynamické zhášení a statické zhášení (Lakowicz, 2006).

Dynamické zhášení je charakterizováno deaktivací již excitovaného fluoroforu srážkou se zhášecí molekulou bez chemické změny molekuly fluoroforu. Fluorofor se v tomto případě vrací z excitovaného stavu zpět na základní energetickou hladinu bez emise světelného záření. Energie je přenesena na molekulu zhášedla a mění se na teplo. Jako zhášedla se mohou chovat například halogeny, kyslík nebo aminy.

Druhým základním typem zhášení je statické zhášení, při němž dochází k tvorbě nefluorescenčního komplexu s molekulou zhášedla. Tento komplex je sice schopný absorbovat foton, ale okamžitě poté přechází zpět do základního stavu. Emitovat fluorescenční záření pak mohou pouze disociované molekuly.

Zvláštním typem zhášení je samozhášení, ke kterému dochází u některých fluoroforů při vysoké koncentraci (Song et al., 1997).

Dalším typem zhášení je expozice fluoroforu vysokým tokům fotonů, kdy jsou saturovány energetické stavy do takové míry, že po určitou dobu je fluorofor v natolik stabilním stavu, že ztrácí schopnost fluorescence. Tohoto jevu se využívá v některých mikroskopických aplikacích s rozlišením prolamujícím difrakční limity rozlišení ve viditelném spektru (např. STED) (Hell & Wichmann, 1994).

Míra zhášení fluoroforu je často velmi důležitým faktorem pro praktickou využitelnost jednotlivých fluorescenčních sond.

## 2.6 Vizualizace cholesterolu v buněčných systémech

Cholesterol je molekulou bez fluorescenčních vlastností, proto ji nelze přímo pozorovat. Studium cholesterolu v buňce lze ale realizovat pomocí rozmanitých sond, přičemž každou z nich lze specificky využít v určité oblasti biochemie membrán a buněčné biologie. V dnešní době se výzkum cholesterolu realizuje pomocí dvou hlavních skupin sond. Do jedné skupiny lze zařadit molekuly, které specificky interagují s cholesterolem a slouží jako sondy, do druhé pak analogy cholesterolu s navázaným fluoroforem nebo přímo s vlastní fluorescencí. Je velmi důležité zvolit vhodnou fluorescenční sondu, která je díky svým vlastnostem vhodná pro určitou analýzu, je citlivá ke změnám okolí a nenarušuje svou přítomností funkci sledovaného systému (Lakowicz, 2006). Využití detekčních molekul jako nástrojů ke studiu cholesterolu často naráží na limity, které je třeba respektovat a zohlednit při interpretacích výsledků.

### 2.6.1 Molekuly specificky interagující s cholesterolem a sloužící jako sondy

#### 2.6.1.1 Cholesterol oxidáza

Cholesterol oxidáza je enzym ze skupiny oxidoreduktáz, který je součástí metabolismu poměrně velkého počtu různých druhů bakterií (*Streptomyces violascens*, *Nocardia erythropolis* nebo *Brevibacterium sterolicum*) (MacLachlan et al., 2000). Tento flavoenzym katalyzuje oxidaci cholesterolu vedoucí ke vzniku cholest-4-en-3-on a peroxidu vodíku. Právě koncentrace vznikajícího peroxidu vodíku může být kvantifikována po přidavku peroxidázy a následném vzniku chromogenu nebo fluorogenu fotometrickými nebo fluorometrickými metodami (Stadtman et al, 1954).

Cholesterol oxidáza katalyzuje oxidaci cholesterolu lokalizovaného pouze na povrchu buňky. Pomocí tohoto enzymu lze tedy detekovat pouze cholesterol ve vnějším listu plasmatické membrány nikoliv cholesterol lokalizovaný v intracelulárním prostoru buňky (Gottlieb, 1977). S použitím cholesterol oxidázy jako cholesterolové sondy vyvstává i mnoho problémů. Aktivitu enzymu ovlivňuje například lipidové

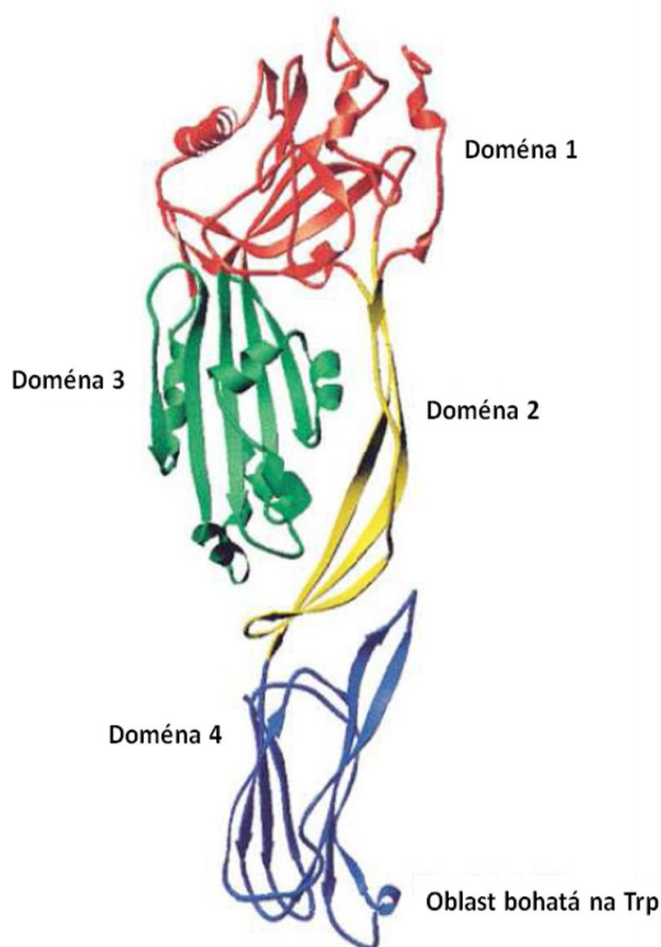
mikroprostředí jejího substrátu. Například cholesterol obsažený v organelových membránách fibroblastů, které mají jiné lipidové zastoupení, není pro cholesterol oxidázu vhodným substrátem a to ani v buněčném homogenátu (Lange, 1991). Dalším problémem je možnost změny propustnosti plasmatické membrány. Po působení tohoto enzymu může v membráně dojít k nefyziologickému průniku malých molekul nebo iontů (Brasaemle & Attie, 1990), což může vést k osmotické nestabilitě a následně i lýze buňky.

### 2.6.1.2 Cholesterol-dependentní cytolysiny

Cholesterol-dependentní cytolysiny náleží do skupiny proteinových endotoxinů produkovaných některými grampozitivními bakteriemi ze skupiny Firmicutes (například *Streptococcus pyogenes* produkující streptolysin O, *Listeria monocytogenes* a její listeriolysin O nebo *Clostridium perfringens* využívající perfringolysin O - Obr. 8) (Palmer, 2001). Jejich toxický účinek spočívá v tvorbě oligomerů tvořících kanály v membránách, které obsahují cholesterol.

Pro studium lokalizace cholesterolu v membráně je používán ve vodě rozpustný a upravený toxin perfringolysin O nazývaný také  $\Theta$ -toxin. Aby bylo možné využívat toxin jako detekční molekulu cholesterolu, bylo nutné zbavit protein cytolytické aktivity odštěpením domén zodpovědných za tuto aktivitu a takto vzniklý tzv. BC $\Theta$ -toxin označit biotinem (Iwamoto et al., 1997), který lze pro detekční účely kombinovat s fluorescenčně značeným avidinem. Podobně jako cholesterol oxidáza má i tento toxin schopnost značit pouze cholesterol nacházející se na povrchu buňky (Tashiro et al., 2004). Pro detekci cholesterolu lze využít i samotnou značenou D4 podjednotku perfringolysinu O, která má stejnou afinitu k cholesterolu jako celý BC $\Theta$ -toxin s preferencí k rigidnějším oblastem membrány – „lipidovým raftům“. D4 podjednotka konjugovaná například s GFP je velmi dobře využitelná jako sonda pro real-time sledování cholesterolu v plasmatické membráně (Ohno-Iwashita et al., 2004).

I přes dobrou využitelnost derivátů perfringolysinu O jako cholesterolových detekčních struktur nejsou tyto molekuly vhodné pro kvantifikaci cholesterolu v membránách.

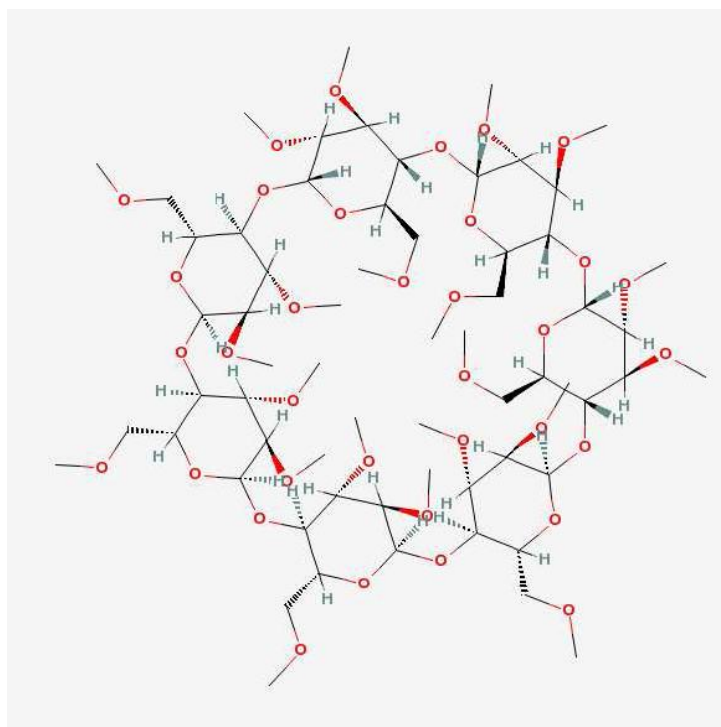


**Obr. 8: Struktura molekuly perfringolysin O.**

Struktura je znázorněna ve stužkovém modelu, kde jednotlivým doménám byly přiřazeny různé barvy. Ve výzkumu se často používá pouze D4 podjednotka konjugovaná s GFP (upraveno podle Rossjohn et al., 1997).

### 2.6.1.3 Cyklodextriny

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy složené z šesti až osmi do prstence spojených D-glukosových podjednotek, svým tvarem připomínají dutý kornout (Obr. 9). Díky expozici OH skupin je povrch makrocyklu hydrofilní, naopak dutina má hydrofobní charakter. Právě díky této hydrofobní kapse jsou cyklodextriny schopné vázat mnoho nepochárných látek. Jeden z derivátů cyklodextrinu – methyl- $\beta$ -cyklodextrin (M $\beta$ CD) selektivně extrahuje cholesterol z plasmatické membrány. „Prázdný“ M $\beta$ CD funguje jako akceptor cholesterolu, naopak komplex M $\beta$ CD/cholesterol může v závislosti na rovnováze sloužit i jako donor cholesterolu (Gimpl et al., 1997).



**Obr. 9: Struktura methyl- $\beta$ -cyklodextrinu.**

Struktura je složená z šesti až osmi D-glukózových podjednotek, které vytváří hydrofobní kapsu pro vazbu cholesterolu (upraveno podle [www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)).

#### 2.6.1.4 Polyenová antibiotika

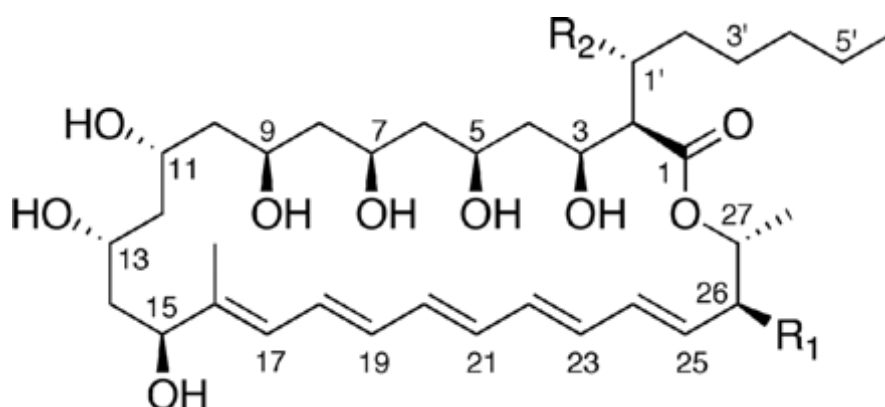
Polyenová antibiotika využívaná k detekci cholesterolu náleží mezi makrolidy (oddíl 2.3). Díky své fluorescenci a schopnosti interakce s cholesterolem jsou některé z nich důležitými cholesterolovými sondami.

##### 2.6.1.4.1 Filipin

Filipin byl izolován v roce 1955 z kultury bakterií *Streptomyces filipinensis* získané z půdních vzorků tichomořských ostrovů Filipíny (Whitfield et al., 1955).

Kovalentní struktura filipinu III (Obr. 10) byla poprvé popsána v roce 1964 jako makrolidová struktura s laktonovým dvaceti osmi uhlíkatým kruhem s osmi hydroxylovými skupinami a pěti konjugovanými dvojnými vazbami (Ceder et al., 1964).

Makrolid filipin představuje jednu z nejdůležitějších molekul pro studium lokalizace a distribuce volného cholesterolu v buňce (Robinson & Karnovsky, 1980). Sestává ze čtyř typů navzájem podobných molekul označovaných jako filipin I, II, III a IV, z nichž je filipin III nejvýznamnější pro účely vizualizace cholesterolu a nejvíce zastoupenou složkou filipinu (Bolard, 1986). V procentuálním vyjádření je filipin III zastoupen v typicky produkované směsi z 53 %, filipin II z 25 %, filipin IV z 18 % a filipin I ze 4 %. Jednotlivé typy filipinů se od sebe liší počtem OH skupin nebo izomerií (Obr. 10).

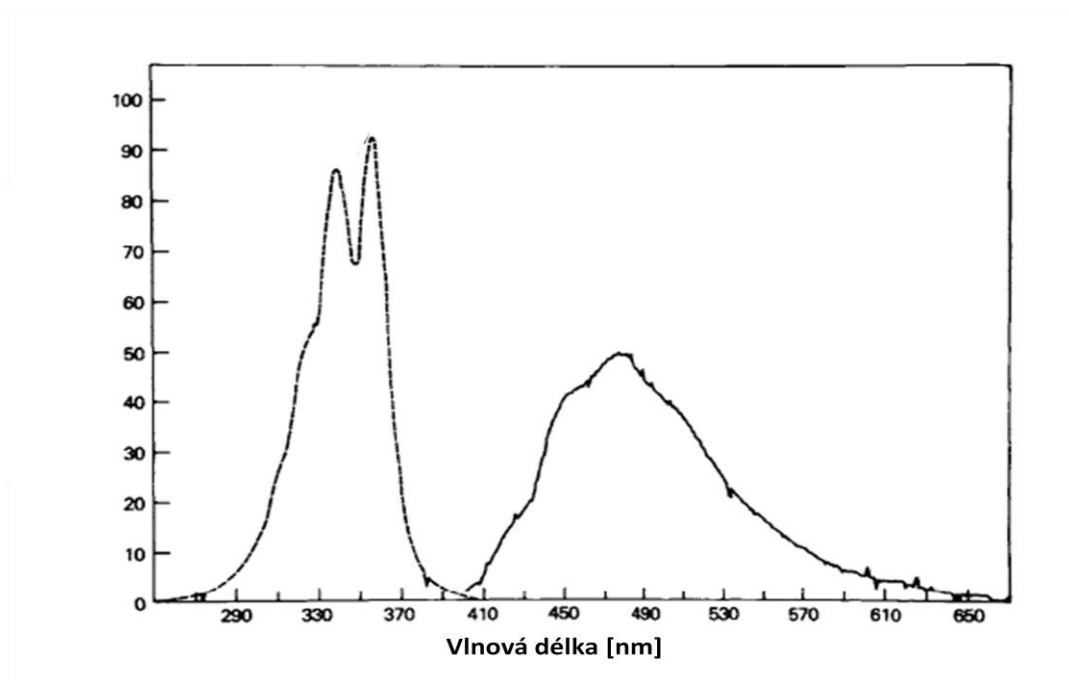


**Obr. 10: Struktura molekuly filipinu.**

Jednotlivé typy filipinu se navzájem liší počtem OH skupin nebo izomerií. Filipin I:  $R_1 = H$  a  $R_2 = H$ , filipin II:  $R_1 = OH$  a  $R_2 = H$ , filipin III:  $R_1 = OH$  a  $R_2 = OH$ . Filipin IV je pouze isomer filipinu III (Xu et al., 2009).

Podle výsledků prvotních studií byly bakteriální protoplasty rezistentní k působení polyenového antibiotika filipinu, naopak vazebná interakce byla pozorována s membránami připravenými z hovězích erytrocytů. Navazující výzkumy na umělých monovrstvách, které byly složeny z několika kombinací různých lipidů, prokázaly, že filipin proniká do těchto struktur za současné přítomnosti sterolů (Demel et al., 1965). Později byly tyto výsledky potvrzeny dalšími metodami, například i pomocí mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy – AFM). Touto metodou byla prokázána tvorba sférických útvarů na umělých membránách, které obsahovaly steroly. Naopak na membránách bez obsahu sterolů tyto útvary nevznikaly (Santos, 1998). Naproti tomu někteří autoři na základě svých výsledků navrhli, že přítomnost cholesterolu není nezbytná pro vazbu filipinu do membrán (Lopes et al. 2004).





**Obr. 11: Excitační (- - -) a emisní spektrum (—) filipinu III v HBSS.**

Excitační spektrum bylo měřeno při emisi 482 nm, emisní spektrum při excitaci 356 nm (Muller et al, 1984).

Filipin se váže na neesterifikovaný cholesterol přítomný pouze v plasmatické membráně a dalších intracelulárních membránách s přímou vezikulární kontinuitou s plasmatickou membránou (Golgiho aparát, endozomy). Ostatní vnitrobuněčné membrány (mitochondrie, membrána jádra, endoplasmatické retikulum) zůstávají filipinem víceméně neznačeny. Tento jev není možné vysvětlit nepřítomností nebo pouze malým obsahem cholesterolu v těchto membránách, ale v některých případech spíše určitým mikroprostředím, které vazbu cholesterolu a filipinu znemožňuje. Podobný mechanismus lze pozorovat u váčků obalených klatrinem, které nejsou filipinem značeny. Po odstranění klatrinových triskelionů je membrána endocytického váčku pozitivní pro filipinový signál (Steer et al., 1984).

Filipin se stal díky svým fluorescenčním vlastnostem (Obr. 11) často využívanou sondou pro studium lokalizace a distribuce buněčného cholesterolu (Behnke, 1984). Zatím však nejsou dostupná data o přesné interakci molekuly filipinu a cholesterolu díky velmi malé rozpustnosti jejich komplexů ve vodných roztocích pro NMR spektroskopii. Interakce byla doposud studována pouze nepřímými metodami, díky nimž bylo zjištěno, že pro vazbu filipinu na membránové steroly je esenciální přítomnost neesterifikované  $3\beta$ -OH skupiny, planárního jádra molekuly a pro silnou

interakci také přítomnost nepolárního postranního řetězce na uhlíku C17 (Bittman et al., 1983).

Značení buněk filipinem vyžaduje jejich fixaci a následně poměrně dlouhou inkubaci v přítomnosti filipinu v pokojové teplotě. V živých buňkách způsobuje filipin dramatickou reorganizaci intramembránových komponent, proto je nutné pro získání signifikantních výsledků buňky předem fixovat. Dodnes ovšem není známo, zda filipin opravdu značí struktury s upořádáním, které je ekvivalentní i v živých buňkách, nebo zda se jedná o artefakty vzniklé fixací buněk. Filipin nelze díky své vysoké toxicitě vůči savcím buňkám využít v medicíně jako antibiotikum.

V nedávné době byl prokázán vliv filipinu na lipidové rafty. Selektivně inhibuje raftovou/kaveolární endocytózu, je také využíván při studiu signalizace (Chichili et al., 2010).

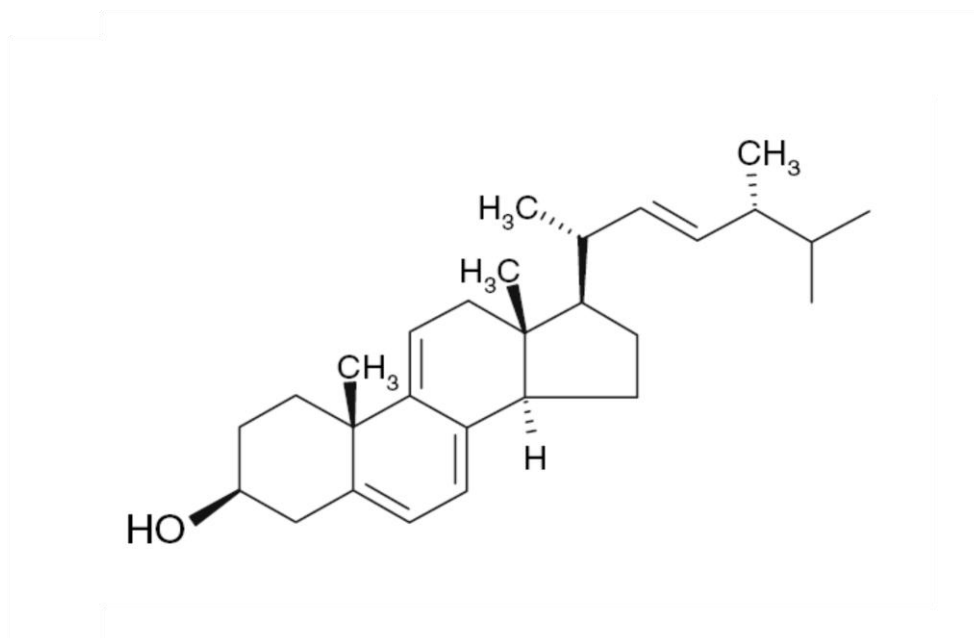
#### 2.6.1.4.2 Amfotericin B, nystatin

Amfotericin B a nystatin jsou molekuly, které se využívají nejen v medicíně jako antibiotika a antimykotika, ale i díky svým fluorescenčním vlastnostem a schopností vazby na steroly jako nástroje pro detekci cholesterolu v membránách. Od filipinu se odlišují především schopností tvořit komplexy s cholesterolem, které v membránách indukují tvorbu kanálů. Na rozdíl od filipinu není jejich využití jako fluorescenčních cholesterolových sond příliš rozšířené díky jejich slabší vazbě na cholesterol (Bittman & Frischkoff, 1972) a horším spektrálním vlastnostem.

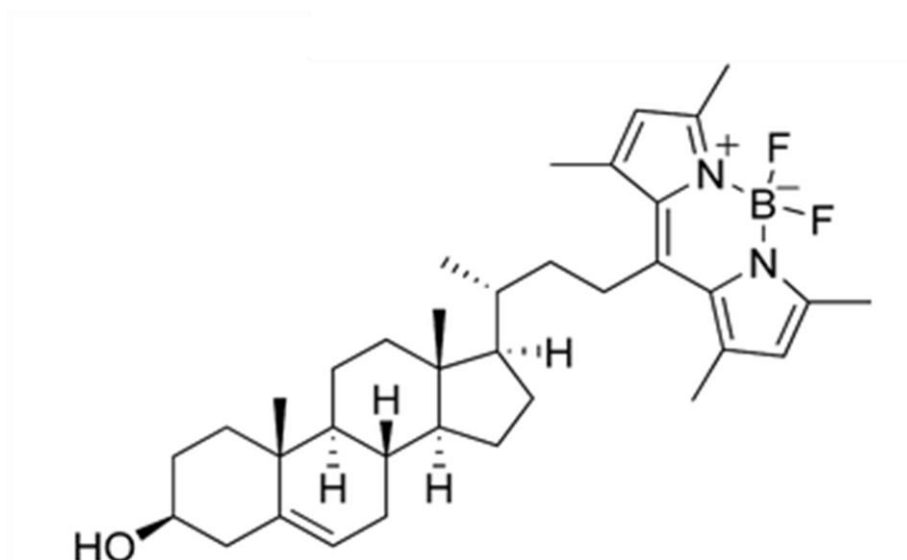
### 2.6.2 Analogy cholesterolu

Analogy cholesterolu jsou molekuly strukturně velmi podobné cholesterolu. Na rozdíl od něj jsou samy fluorescenční díky přítomnosti fluorescenčních skupin. Mezi hlavní charakteristiky, které musí spolehlivý analog cholesterolu splňovat, náleží planární tetracyklický systém s  $\Delta^{5(6)}$  dvojnou vazbou, přítomnost volné 3 $\beta$ -OH skupina, methylová skupina a alifatický postranní řetězec na 17 $\beta$ -pozici (Schroeder, 1984). Takové molekuly lze rozdělit do dvou hlavních skupin na analogy s vlastní fluorescencí (dehydroergosterol – Obr. 12, cholestatrienol) a analogy s připojeným fluoroforem (NBD-cholesterol, dansyl-cholestanol, BODIPY-cholesterol – Obr. 13). Všechny do současné doby vyvinuté analogy cholesterolu nevykazují přesně shodné chování

s cholesterolem. Steroly, které náleží do skupiny analogů s vlastní fluorescencí, cholesterol lépe napodobují, ale mají nepříznivé fluorescenční vlastnosti. Modifikované steroly náležející do druhé skupiny mají navíc poměrně velkou fluorescenční skupinu, která jim často neumožňuje dokonale napodobovat cholesterol. Jejich spektroskopické vlastnosti ale bývají lepší než u analogů s vlastní fluorescencí.



**Obr. 12:** Chemická struktura dehydroergosterolu (Gimpl & Gehrig-Burger, 2007).



**Obr. 13:** Chemická struktura BODIPY-cholesterolu (Li et al., 2006).

## 2.7 Střádavě lysozomální nemoci

Střádavě lysozomální nemoci jsou skupinou dědičných metabolických poruch. Společným jmenovatelem všech těchto chorob jsou defekty transportních enzymů vedoucí k hromadění určitých substrátů v lysozomech uvnitř buněk.

### 2.7.1 Niemann-Pickova choroba typu C

Niemann-Pickova choroba typu C (NPC) je autosomálně recesivní onemocnění. Způsobují ji mutace v genech NPC1 (na chromosomu 18q11) nebo NPC2 (na chromosomu 14q24.3). Gen NPC1 kóduje poměrně velký membránový glykoprotein (~180 kDa) lokalizovaný v pozdních endozomech a lysozomech, gen NPC2 kóduje malý solubilní lysozomální protein. Oba proteiny váží cholesterol s vysokou afinitou. Nedávné studie prokázaly nezbytnou funkční spolupráci obou proteinů i jejich vzájemnou interakci (Wang et al., 2010). Myši s mutovaným pouze NPC1, nebo NPC2 proteinem vykazovaly stejný fenotyp jako myši s mutacemi v obou proteinech (Sleat et al., 2004). Přesná funkce a jejich vztah jsou však zatím neznámé. V případě dysfunkce alespoň jednoho z těchto proteinů je porušen transport cholesterolu přijatého z LDL partikulí. Důsledkem je patologické hromadění neesterifikovaného cholesterolu v endozomálně-lysozomálním systému.

NPC se řadí mezi vzácné dědičné choroby, v populaci se projevuje s incidencí 1:120 000 až 1:150 000. Klinický průběh je velmi individuální. První příznaky se objevují od perinatálního období do 60 let. U pacientů se projevují systémová postižení: postižení jater (cholestatický ikterus s hepatosplenomegalií) nebo sleziny, i neurologická postižení: opožděný motorický vývoj, obrna a časté křeče.

Diagnostickým nástrojem pro NPC je test filipinem. Fibroblasty odebrané pacientům se kultivují na Petriho miskách s vhodným médiem. Po fixaci se barví makrolidem filipinem. Patologické hromadění cholesterolu v aberantních lysozomech je vizualizováno fluorescenčním mikroskopem. Chorobu lze filipinovým testem určit jen asi v 80 % případech (Vanier & Millat, 2003), protože u některých pacientů se neobjevuje klasický fenotyp choroby. Často je obtížné správně interpretovat aberantní lysozomy barvené filipinem, jelikož filipin má velmi podobnou fluorescenci jako je autofluorescence samotných buněk. Obě fluorescence jsou často od sebe obtížně

odlišitelné zvláště při excitaci v UV oblasti, v níž má filipin své excitační maximum (Obr. 11).

V poslední době začíná převládat názor, že NPC není zcela chorobou abnormálního ukládání cholesterolu, jak bylo uváděno dříve, ale spíše poruchou intracelulárního transportu cholesterolu (Karten et al., 2009).

## 2.7.2 Gaucherova choroba

Gaucherova choroba je nejčastější autosomálně recesivní střádavě lysozomální poruchou. V populaci se vyskytuje s incidencí 1:60 000. U aškenázských Židů je výskyt četnější s incidencí 1:5000–1:1000. Gaucherova choroba je způsobena absencí nebo sníženou funkcí enzymu beta-glukocerebrosidázy (GBA), který je zodpovědný za štěpení složek membrán. Dochází tak k aberantní akumulaci glukosylceramidu, tedy substrátu pro GBA, v lysozomech. Gen pro GBA je lokalizován na chromozomu 1q21 (Barneveld et al., 1983). V současné době je známo přes 300 mutací tohoto genu (Hruska et al., 2008). Narůstající obsah glukocerebrosidů v buňkách může způsobit aktivaci ryanodin-receptoru vedoucí ke zvýšení koncentrace intracelulárního vápníku (Pelled et al., 2005). Jedním z projevů akumulace glukosylceramidu v buňkách je parkinsonismus (Goldin et al., 2011).

Nejčastějšími příznaky jsou hepatosplenomegalie, anémie a zpomalení růstu. Je možné chorobu diagnostikovat z kostní dřeně nebo jaterní biopsie pacientů nalezením střádavých buněk typických pro tuto chorobu (Gaucherovy buňky), ovšem jednoznačným diagnostickým postupem je potvrdit nedostatečnost aktivity GBA v leukocytech periferní krve nebo v kultuře fibroblastů. Mohou být použity i genetické testy.

## 3 Materiál

### 3.1 Seznam použitých mikroorganismů

*Streptomyces durmitorensis* – MS405<sup>T</sup>.

Kultura byla získána v rámci spolupráce s laboratoří Dr. Miroslava Fliegra, Mikrobiologický ústav AV ČR.

*Escherichia coli*

kmen DH5α -  $\Delta M15$ , *recA*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* ( $r_K^-$ ,  $m_K^+$ ), *supE44*, *relA1*, *deoR*

Kmen byl uchováván v zamrazeném stavu v - 80 °C.

*Saccharomyces cerevisiae*

kmen EGY48 – *MATα*, *his3*, *trp1*, *ura3*, *LexA<sub>op(x6)</sub>* – *LEU2*

Kvasinkový kmen získaný od doc. Františka Půty, Katedra buněčné biologie, PřF UK.

Kmen byl uchováván v zamrazeném stavu v - 80 °C.

### 3.2 Buněčné kultury

**HeLa**

ATCC, buněčná kultura poskytnutá prof. RNDr. Václavem Hořejším, CSc., Ústav molekulární genetiky AV ČR.

Buňky byly získány z nádorových buněk epitelu děložního hrdla. Jedná se o adherentní linii.

**Jurkat**

ATCC, buněčná kultura poskytnutá prof. RNDr. Václavem Hořejším, CSc., Ústav molekulární genetiky AV ČR.

Transformovaná imortalizovaná T-lymfocytární linie původem z T-lymfocytární leukémie s lymfoblastoidní morfologií.

Produkuje IL-2 a je pozitivní na CD3, CD4, TCR. Jedná se o linii suspenzních buněk.

**Primární kožní fibroblasty**

V rámci spolupráce s prof. MUDr. Milanem Ellederem byly získány tři linie lidských primárních fibroblastů získaných standardním proteolytickým rozvolněním kožních biopsií.

Jedná se o buněčný materiál z kontrolního jedince (u kterého nebyla diagnostikována jakákoliv lysozomální či jiná metabolická patologie) a od pacientů trpících lysozomálně stádavými chorobami – Gaucherovou chorobou nebo Niemann-Pickovou chorobou typu C.

### 3.3 Kultivační média a roztoky

**Média pro *Streptomyces durmitorensis*:****NE médium**

glukóza	10g/l
kvasničný extrakt	2 g/l
hovězí extrakt	1 g/l
casamino kyseliny	2 g/l
[agar	15 g /l]
pH 7	

Médium bylo připravováno z destilované vody a sterilizováno v autoklávu 20 min při 119 °C

**TSB (Tryptic Soy Broth) médium**

Bacto™ Tryptone	17 g/l
Bacto Soytone	3 g/l
glukóza	2,5 g/l
NaCl	5 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g/l
manitol	10 % (w/v)
pH 7,3	

Médium bylo připravováno z destilované vody a sterilizováno v autoklávu 20 min při 119 °C

**Médium pro kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* – YPAD médium:**

Universalpepton M66	22 g/l
kvasničný extrakt	11 g/l
glukóza	6 g/l
adenin hemisulfát	110 mg/l
[agar	15 g /l]
pH 6,5	

Médium určené pro kultivaci kvasinek bylo připravováno z destilované deionizované vody a sterilizováno v autoklávu 20 min při 119 °C. Po klávoání bylo médium ochlazené na teplotu přibližně 50 °C a poté přidáno antibiotikum ampicilin (výsledná koncentrace 100 ug/ml). Po zamíchání bylo takto připravené tekuté médium uchovááno v chladničce ve 4 °C. V případě přípravy pevné agarové půdy byl roztok nalit do Petriho misek a ponechán v pokojové teplotě ztuhnout. Plotny byly uchováány v chladničce dnem vzhůru při teplotě 4 °C.



**Médium pro bakterie *Escherichia coli* – LB médium:**

Trypton	10 g/l
kvasničný extrakt	5 g/l
chlorid sodný	10 g/l
[agar	15 g /l]
pH 7	

Médium bylo připravováno z destilované vody a sterilizováno v autoklávu 20 min při 119 °C. Do média již nebylo přidáváno žádné antibiotikum. Takto připravené tekuté médium bylo uchováváno v chladničce ve 4 °C. V případě přípravy pevné agarové půdy byl roztok nalit do Petriho misek a ponechán v pokojové teplotě ztuhnout. Plotny byly uchovávány v chladničce dnem vzhůru při teplotě 4 °C. V tomto médiu byl také v určitých případech kultivován *Streptomyces durmitorensis*.

**Médium RPMI 1640 pro savčí buňky Jurkat:**

RPMI 1640	90% (v/v)
FBS	10% (v/v)
gentamycin	40 µg/ml
glutamin	2mM
β-merkapt ethanol	50µM
HEPES	10mM
pyruvát sodný	1mM
bikarbonát sodný	26,5µl/ml

Médium bylo připravováno sterilně a skladováno v teplotě 4 °C. Před jeho použitím pro kultivační účely bylo zahřáto na teplotu cca 37 °C.

**Médium DMEM pro savčí buňky HeLa:**

DMEM médium	90% (v/v)
FBS	10% (v/v)
gentamycin	40 µg/ml
glutamin	0,25 mg/ml

Médium bylo připravováno sterilně a skladováno v teplotě 4 °C. Před použitím bylo zahřáto na teplotu cca 37 °C.

**10x Trypsin EDTA pro tkáňové kultury**

prasečí trypsin	0,5 g/l
EDTA	0,2 g/l
NaCl	0,9% (w/v)

Zásobní roztok bylo nutné před použitím ředit 10x v PBS.

## 3.4 Pufry

**HBSS**

HEPES kyselina	10mM
NaCl	140mM
KCl	5mM
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2mM
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	3mM
glukóza	1% (w/v)
deionizovaná H <sub>2</sub> O	
pH 7,4	

**PBS**

NaCl	138mM
KCl	3mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O	12mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2mM
deionizovaná H <sub>2</sub> O	
pH 7,4	

**TBE pufr (5x koncentrovaný)**

Tris-HCl	89mM
kyselina boritá	89mM
EDTA	2mM
pH 8,0	

Pufr byl připraven z destilované vody. Před použitím byl tento pufr ředěn 5x destilovanou vodou.

**TBS**

Tris	50mM
NaCl	150mM
deionizovaná H <sub>2</sub> O	
pH 7,4	

**Vzorkový pufr (4x koncentrovaný)**

Glycerol	50%
EDTA	0,13M
bromfenolová modř	0,12%
pH 8,0	

Roztok byl před použitím smíchán se vzorkem v poměru 1:3.

**Roztok pro měření vodivosti černých lipidových membrán**

Tris	100mM
KCl	1M
pH 7,4	

### 3.5 Montovací média

**Mowiol**

glycerol	20% (w/v)
Mowiol 4-88	10% (w/v)
Tris-HCl	0,1M
pH 8,5	

Mowiol byl skladován ve 4 °C.

Návod na přípravu Mowiolu:

- K 6 g analyticky čistého glycerolu se přidá 2,4 g Mowiolu (4-88 Calbiochem) a vše je důkladně asi 1 h promícháno.
- Dále se přidá 6 ml destilované vody. Roztok se ponechá 2 hodiny při pokojové teplotě.
- K roztoku se přidá 12 ml 0,2M Tris-HCl, který se následně inkubuje ve vodní lázni při 50 °C, dokud se vše nerozpustí.
- Roztok se centrifuguje na 5000 x g po dobu 15 minut.

## 3.6 Použité chemikálie

Adenin hemisulfát, Sigma-Aldrich, USA  
Agar, Difco, USA  
Agaróza, Serva, Německo  
Ampicilin, Carl Roth, Německo  
Annexin-V/647, Sigma-Aldrich, USA  
Annexin-V/FITC, Exbio, ČR  
Annexin-V Binding Buffer, Exbio, ČR  
Azolectin, Sigma-Aldrich, USA  
Bakteriologický agar, Serva, Německo  
Benzen, Lachema, ČR  
BSA (Bovine serum albumin), Sigma-Aldrich, USA  
Butanol, Penta, ČR  
Cykloheximid, Sigma-Aldrich, USA  
D- $\alpha$ -Phosphatidylcholine, dipalmitoyl, Sigma-Aldrich, USA  
D-MEM (- L-glutamin, - phenolred), Gibco, Invitrogen, USA  
DAPI, Molecular Probes, USA  
Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA  
Dimyristoylfosfatidylcholin, Sigma-Aldrich, USA  
Dekan, Penta, ČR  
EDTA, Fermentas, Kanada  
Ergosterol, Sigma-Aldrich, USA  
Ethanol, Penta, ČR  
Faloidin Alexa Fluor 594, Molecular Probes, USA  
FBS, Biotech, ČR  
Filipin III, Sigma-Aldrich, USA  
Formaldehyd, Sigma-Aldrich, USA  
GelRed Nucleid Acid, Lab Mark, ČR  
Gene Ruler 100bp, DNA ladder Plus 0,5  $\mu\text{g}/\mu$ , Fermentas, Kanada  
Glukóza, Lachema, ČR  
Glutamin, Gibco, Invitrogen, USA  
HEPES, Gibco, Invitrogen, USA  
Cholesterol, Sigma-Aldrich, USA

Chlorid amonný, Sigma-Aldrich, USA  
Chlorid draselný, Penta, ČR  
Chloroform, Lachema, ČR  
Kyselina askorbová, Penta, ČR  
LB medium, Carl Roth, Německo  
LysoTracker Red DND-99, Molecular Probes, USA  
Methanol, Penta, ČR  
Merkaptoethanol, Sigma-Aldrich, USA  
MitoTracker CMXRos, Molecular Probes, USA  
Mowiol 4-88, Calbiochem, ČR  
PBS (koncentrát 10x) - chemikálie na přípravu, Penta, ČR  
Propidium jodid, Exbio, ČR  
Pyruvát sodný, Sigma-Aldrich, USA  
RPMI 1640 (- L-glutamin, - phenolred), Gibco, Invitrogen, USA  
Sacharóza, Penta, ČR  
Síran sodný bezvodý, Lach-Ner s.r.o., ČR  
Sodium dodecyl disulfát, Carl Roth, Německo  
TRAIL, Apronex, ČR  
Transferrin Dyomics 547, Exbio, ČR  
Triton X-100, Serva, Německo  
Trypsin EDTA, Gibco, Invitrogen, USA  
TSB médium, Difco, USA  
U18666A inhibitor, Sigma-Aldrich, USA  
Universalpepton M66, OXOID, United Kingdom  
Yeast extract, OXOID, United Kingdom  
YPAD, Carl Roth, Německo

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

**Protilátky**primární protilátky

- 11-250-C100 mAb  $\alpha$ -tubulin, myší IgG1 (klon TU-01), Exbio, ČR
- sc-20011 LAMP-1, myší monoklonální IgG (klon H4A3), Santa Cruz Biotechnology, USA
- sc-6415 EEA1, kozí polyklonální IgG (klon N-19), Santa Cruz Biotechnology, USA

sekundární protilátky

- A-11001 Alexa Fluor 488 kozí antimyší IgG, Molecular Probes, USA
- A-11005 AlexaFluor 594, kozí antimyší IgG, Molecular Probes, USA
- A-11058 AlexaFluor 594, oslí antikoží IgG, Molecular Probes, USA

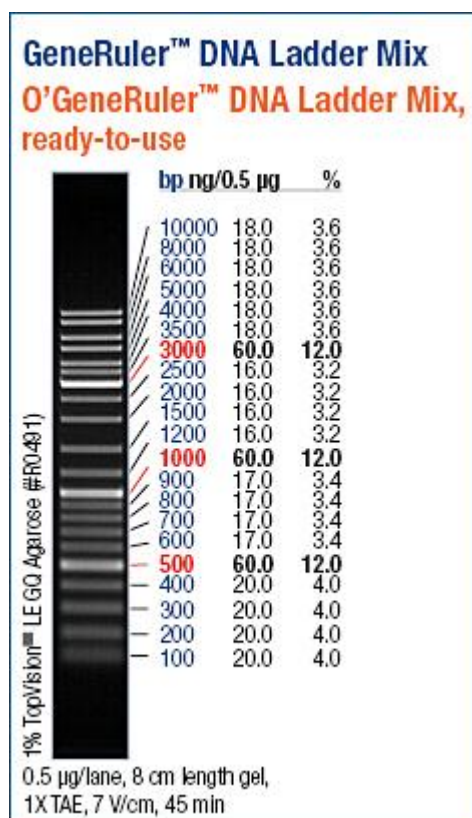
**Kity**

- D4002 Zymoclean gel DNA recovery kit (Zymoresearch)
- KIT-ANXD Apoptosis assay kit – Dyomics 647 (Exbio)
- KIT-ANXF Apoptosis assay kit – FITC (Exbio)
- L-3224 LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes)

**Primery**

U515F a U1406R – primery ohraničující gen pro bakteriální SSU

## Standardy molekulových hmotností



Standard DNA fragmentu GeneRuler  
 DNA Ladder Mix (MBI Fermentas)

## 3.7 Laboratorní sklo a plastik

plastik (Nunc, Eppendorf, VVR, Eurotubo Deltalab)

plastik pro tkáňové kultury (Nunc)

laboratorní jehly a stříkačky (B-Braun)

mikroskopická sklíčka (P-Lab)

V experimentech bylo používáno běžné laboratorní sklo. Jeho sterilizace probíhala v autoklávu při 121 °C a po dobu 20 min.



## 3.8 Přístroje

Autokláv PS20A (Chirana)  
Binolupa SteREO Lumar.V12 (Carl Zeiss)  
Bürknerova komůrka (Meopta)  
Centrifuga Universal 16 R (Hettich Zentrifugen)  
Fluorescenční mikroskop Cell<sup>R</sup> (Olympus)  
Fotoaparát DMC-FZ7 (Panasonic)  
FTIR spektrometr Vector 33 (Bruker)  
Invertovaný fluorescenční mikroskop IX71 (Olympus)  
Konfokální mikroskop Leica TCS SP2 (Leica)  
Konfokální mikroskop LSM 780 (Carl Zeiss)  
Kývačka Biometra (Schoeller Instruments)  
Kyvety CaF<sub>2</sub> pro FTIR - 8μm (Chevtchenko Optics)  
Kyvety křemenné (TSL England)  
Laboratorní váhy ABCplus-600H (ADAM Equipment)  
Laminární box Clean air (Biohazard)  
Minicentrifuga Minispin plus (Eppendorf)  
Mikrovlnná trouba ZMV19M (Zannussi)  
Mikrozkumavky 0,6 ml, 1,5 ml (Eppendorf)  
Mrazicí box (-80 °C) UltraLow (Sanyo)  
Mrazicí box (-20 °C) Premium NoFrost (Liebherr)  
Naprašovač vzorků pro SEM BAL-TEC SCD 050  
Optický Filtr 3RD405LP (Omega Filters)  
pH-metr inoLab Level 1 (WTW)  
Pipety (Eppendorf)  
Průtokový cytometr BD<sup>TM</sup> LSR II (BD Biosciences)  
Sekvenátor Avant 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems)  
SEM mikroskop – JSM-6380LV (JEOL)  
Spektrofluorometr FluoroMax-3 (Jobin Yvon Horiba)  
Spektrofotometr UVmini 1240 (SHIMADZU)  
Stolní centrifuga Minispin Plus (Eppendorf)  
Temperovaná třepačka Orbital shaker (Thermothon)

Termoblok Termomixer comfort (Eppendorf)  
Termocycler XP Cycler (Bioer)  
Termostatický inkubátor (Angelantoni)  
Transiluminátor TC-20-MC (Vilber Lourmat)  
Vakuový naprašovač vzorků – Bal-Tec SCD 050 Sputter counter (BalTec)  
Vortex MS2 Minishaker (Schoelller)  
Vyhřívací deska VD2 (VEZAS)  
Vysoušeč vzorků pro SEM BAL-TEC CPD 030 (BalTec)  
Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu Powerstation 300 (Labnet)

## 3.9 Software

BLM2 (Jiří Bok, MFF UK)  
Cell<sup>A</sup>, Cell<sup>R</sup> 2.8 (Olympus)  
DataMax 2.20 (Jobin Yvon Horiba)  
DP Controller 2.2.1.227 (Olympus)  
FACSDiva 6.1.2 (BD Biosciences)  
FlowJo 9.4 (Mario Roederer)  
Fityk 0.8.6 (Marcin Wojdyr) <http://fityk.nieto.pl>  
GateLogic 308.0A (Inivai)  
GRAMS/32 AI 6.00 (Thermo Fisher Scientific)  
GRAMSCNW (JY Viewer for SPC files) 1.2  
Chromas Lite 2.01 (Technelysium)  
ImageJ 1.45 (National institutes of Health) <http://rsbweb.nih.gov>  
Leica Confocal Software 2.61 (Leica)  
Microsoft Excel (Microsoft Office 2007)  
Olympus Soft Imaging Solution (Olympus)  
OPUS 4.0 (Bruker)  
QuB 2.0.0.7 (Queen's University Belfast) <http://www.qub.buffalo.edu>  
QuickPHOTO MICRO 2.3 (Promicra)  
SEM Control User Interface 7.03 (JOEL)  
Topspin 1.3 (Bruker)

## 4 Metody

### 4.1 Kultivace *Streptomyces durmitorensis*

Pro kultivaci bakterií *Streptomyces durmitorensis* bylo použito NE živné médium a produkční TSB médium.

- Buňky byly sterilně zaočkovány naisky s pevnou NE půdou a kultivovány v termostatu při 30 °C.
- Přibližně po týdnu – tedy době potřebné pro tvorbu spor – bylo do Petriho misek s narostlým myceliem přidáno 1–2 ml tekutého NE média.
- Spory byly pomocí sterilních špiček setřeny do tohoto média a zaočkovány do většího objemu tekutého NE média.
- Kultury byly kultivovány 14 dní v 28 °C na rotační třepačce (200 rpm).
- Inokulum (cca 5 ml) z NE média bylo zaočkováno do produkčního TSB média
- V tomto médiu byly bakterie kultivovány na rotační třepačce ve 28°C po dobu 14 dní (200 rpm).

### 4.2 Extrakce 32,33-didehydroroflamykoinu ze *Streptomyces durmitorensis*

- Narostlé kultivované buňky byly centrifugovány po dobu 20 min při 15 000 x g za stálé teploty 22°C.
- Následně byly buňky přeneseny na Büchnerovu nálevku a zfiltrvány. Buněčná peleta byla setřena z filtračního papíru a přenesena do destilovaného ethylacetátu. Suspenze byla míchána pomocí magnetického míchadla na míchačce při pokojové teplotě po dobu 24 h.
- Po uvolnění žlutých pigmentů do ethylacetátu byla buněčná suspenze přenesena opět na Büchnerovu nálevku a zfiltrována pro oddělení buněčné masy od

roztoku. Do filtrátu byl přidán bezvodý síran sodný pro odstranění zbytkové vody a znovu přefiltrován přes Büchnerovu nálevku.

- Pomocí rotační vakuové odparky byl filtrát zbaven ethylacetátu, získaná sušina 32,33-didehydroroflomykoinu (DDHR) ulpěla na stěnách odparné baňky. Frakce byla uchovávána v -20 °C.

## 4.3 Kultivace savčích buněk

Savčí buněčné linie byly kultivovány v lahvi pro tkáňové kultury s pracovním objemem 30 ml v temperovaném inkubátoru při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO<sub>2</sub> s vlhkostí prostředí 100 %. Pasážování buněk a výměna média probíhala přibližně dvakrát za týden.

### Adherentní buňky

Adherentní buňky byly pasážovány sterilně v laminárním boxu vždy v době, kdy na dně kultivační nádoby vytvořily souvislou vrstvu. Buňky byly pěstovány v médiu DMEM v inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> a dvakrát týdně pasážovány pomocí trypsinu s EDTA:

- Původní médium bylo odstraněno a buňky byly opláchnuty asi 3 ml PBS.
- K buňkám bylo přidáno 5 ml PBS s trypsin EDTA a vše bylo ponecháno v pokojové teplotě maximálně 5 min. Během této doby byl stav buněk kontrolován mikroskopem (zvětšení cca 100 x).
- Po uvolnění většiny buněk ze dna kultivační nádoby bylo přidáno médium DMEM pro zastavení enzymatické aktivity trypsinu a vzniklý roztok s trypsinem odsát z kultury.
- Do kultivační nádoby bylo přidáno asi 5 ml média umožňující další kultivaci buněk.
- Pro kultivaci buněk v destičkách s jamkami (popřípadě s krycími sklíčky) byl roztok média s trypsinem odsát z kultivační nádoby. Suspenze byla centrifugována (5 min, 200 x g, 23 °C) a následně resuspendována v příslušném objemu čerstvého média DMEM.

- Do jamek v destičce bylo přidáno po 1–2 ml média DMEM a podle konkrétních požadavků na množství buněk v destičce přidán určitý počet kapek z resuspenovaných buněk (viz předchozí bod). V některých případech bylo na dno jamek vloženo mikroskopické sklíčko, které bylo upraveno poškozením v TK vodě.

Pro další udržovací kultivaci byla v kultivační nádobě ponechána asi 1/10 buněk.

### **Buňky Jurkat**

Suspenzní buňky byly pasážovány sterilně v laminárním boxu přibližně dvakrát za týden a kultivovány v RPMI 1640 médiu v inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>.

Pasážování buněk Jurkat:

- Buňky byly Pasteurovou pipetou resuspendovány, semiadherované buňky opláchnuty ze dna kultivační nádoby a částečně odsáty (cca 3/4 celkového objemu). K buňkám ponechaným v nádobě bylo přidáno asi 5 ml nového média.

## **4.4 Kultivace kvasinek**

### ***Saccharomyces cerevisiae* EGY48**

Kvasinkové kultury byly krátkodobě uchovávány na pevných YPAD půdách při teplotě 4 °C a přeočkovány přibližně 1 x za měsíc. Dlouhodobě pak byly uchovávány zamrazené v glycerolu v - 80 °C (40% glycerol smíchaný s kulturou v tekutém YPAD médiu v poměru 1:1).

- Pro jednotlivé experimenty byla ze zásobních ploten odebrána jedna sterilní klička buněk a zaočkována do 100ml Erlenmeyerovy baňky s 10 ml sterilního tekutého média YPAD.
- Kultivace probíhala v třepané kultuře (200 rpm) při 30 °C.

## 4.5 Kultivace bakterií

### *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Bakteriální kultury byly krátkodobě uchovávány na pevných LB půdách při 4 °C. Dlouhodobě byly uchovávány v alikvótách zamražených v glycerolu (40% glycerol smíchaný s kulturou v tekutém LB médiu, narostlou do stacionární fáze, v poměru 1:1) při teplotě - 80 °C.

- Pro jednotlivé experimenty byly bakterie seškrábnuty ze zamražené kultury nebo odebrány sterilní kličkou ze zásobních ploten a vloženy do 100ml Erlenmeyerovy baňky s 10 ml tekutého LB.
- Kultivace probíhala v třepané kultuře (200 rpm) při 37 °C.

## 4.6 Fixace preparátů pro fluorescenční mikroskopii

- Z jamek kultivační destičky s krycími skly porostlými buňkami bylo odstraněno médium. Ihned poté byl k buňkám přidán 3,5% (w/v) formaldehyd v PBS předeřhřátý na 37 °C. Fixace probíhala přibližně 20 minut v pokojové teplotě.
- Poté byla krycí skla s buňkami promývána 2x v PBS vždy po dobu 5 min. Zbytky formaldehydu byly neutralizovány 15mM NH<sub>4</sub>Cl v PBS přidaným k buňkám na 5 min v pokojové teplotě.
- Skla byla opět promyta 2x v PBS po dobu 5 min a ihned použita k fluorescenčnímu barvení nebo krátkodobě uchovávána ve 4 °C v PBS s 0,01% (w/v) azidem.
- Obarvené fixované buňky na krycím skle byly zamontovány do Mowiolu na podložní sklo.

## **4.7 Značení buněk pro fluorescenční mikroskopii**

### **4.7.1 Značení protilátkami**

- Buňky fixované formaldehydem byly permeabilizovány 1–5 minut 0,05% (v/v) Tritonem X-100 v PBS a následně promyty v PBS.
- Buňky byly inkubovány v 1% (w/v) BSA v PBS po dobu 30 minut pro blokování nespecifických vazeb a opět 2x promyty v PBS. Po této inkubaci byla k buňkám přidána primární protilátka v PBS ředěná 500x (pro všechny použité protilátky) ze zásobního roztoku a vzorky byly inkubovány na kývačce 1 hodinu.
- Vzorky byly poté 3x promyty PBS a barveny sekundární protilátkou (500x ředěnou) konjugovanou s fluoroforem po dobu 1 hodiny. Barvení probíhalo na kývačce v temnu. V případě značení buněčného F-aktinu byl k sekundární protilátce přidán ještě faloidin Alexa Fluor 594 (ředění 5000x).
- Po inkubaci byly buňky 4x promyty v PBS a montovány do Mowiolu na podložní skla.

### **4.7.2 Značení živých buněk fluorescenčními sondami buněčných organel**

- Živé buňky byly inkubovány v médiu DMEM s MitoTrackerem nebo LysoTrackerem (ředění 10 000x) v 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> po dobu 15 min.
- Po inkubaci byly buňky fixovány formaldehydem (oddíl 4.6).

### **4.7.3 Barvení tkáňových kultur DDHR**

- Ke tkáňovým kulturám narostlým na krycích sklíčkách, které byly fixovány formaldehydem (oddíl 4.6) a opláchnuty PBS, bylo přidáno požadované

množství DDHR nebo filipinu, s nimiž byly buňky inkubovány na kývačce v pokojové teplotě v temnu po dobu cca 1 h.

- Po inkubaci byly buňky opět propláchnuty PBS a zality do montovacího média Mowiol na podložní sklíčko.

## 4.8 Fluorescenční mikroskopie připravených preparátů

Pro fluorescenční mikroskopii preparátů byl použit fluorescenční mikroskop Olympus Cell<sup>R</sup>, kofokální mikroskop LSM 780 nebo Olympus IX71.

### Fluorescenční mikroskop Olympus Cell<sup>R</sup>

Pro snímání fluorescenčního signálu byly použity tyto fluorescenční kostky:

DAFITR „multiband“ - excitační filtr 350 nm (se šířkou vlnového pásma 50 nm), 497 nm (se šířkou vlnového pásma 18 nm) a 572 nm (se šířkou vlnového pásma 23 nm), emisní filtr 457 nm ( $\pm 22$  nm), 530 nm ( $\pm 20$  nm) a 628 nm ( $\pm 28$  nm). Kostka byla použita pro snímání fluorescence fluoroforů DDHR, filipinu, Alexa Fluor 594 a Alexa Fluor 488.

U-MWIGA3 - excitační filtr 540 nm ( $\pm 10$  nm), emisní filtr 600 nm ( $\pm 25$  nm). Kostka byla použita pro snímání fluorescence fluoroforů Dyomics 547, MitoTracker a LysoTracker.

Ke snímání obrazu byla použita 12-ti bitová monochromatická CCD kamera Hamamatsu ORCA C4742-80-12AG. Objektivy: UPLSAPO 100x 1,4 NA nebo UPLSAPO 60x 1,35 NA. Data byla zpracována pomocí softwaru Cell<sup>R</sup>.

Pro pozorování vzorků na fluorescenčním mikroskopu byla intenzita lampy fluorescenčního mikroskopu snížena na 7 % z důvodu eliminace vysvěcování fluoroforů (photobleaching).



Fluorescenční mikroskop Olympus IX71

Pro mikroskopii preparátů na tomto mikroskopu byly použity tyto fluorescenční kostky:

U-MWU2 – excitační filtr 330–385 nm, emisní filtr od 420 nm (fluorescence filipinu a DDHR)

U-MWB2 – excitační filtr 460–490 nm, emisní filtr od 520 nm (fluorescence kalceinu)

U-MWG2 – excitační filtr 510–550 nm, emisní filtr od 590 nm (fluorescence EthD-1)

Objektivy: LUCPlanFL N 40x/0,60 nebo CPlanFL N 10x/0,30. Data byla zpracována pomocí softwaru Olympus DP Controller nebo Cell^A.

Konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 780

Vzorek byl excitován pomocí laseru s vlnovou délkou 405 nm. Ke snímání fluorescenčního preparátu byl použit objektiv  $\alpha$ Plan-Apochromat 63x/1,46.

Obraz byl detekován 32-GaAsP detektorem.

Fluorescenční binolupa Carl Zeiss SteREO Lumar.V12

Kolonie streptomycet byly snímány přímo z pevných agarových půd objektivem NeoLumar S 0,8x. Ke snímání obrazu byla použita kamera AxioCamHR3.

## 4.9 Polymerase chain reaction (PCR)

Tato metoda byla použita pro amplifikaci genu SSU rDNA *Streptomyces durmitorensis* pro sekvenaci.

- Monokolonie streptomycet byly z kultury narostlé na pevné agarové půdě sterilně odebrány kličkou do malých PCR mikrozkušavek.
- Odebrané bakterie byly resuspendovány v 42  $\mu$ l vody v mikrozkušavce na PCR. K této směsi byla přidána PCR reakční směs. Výsledné složení reakční směsi je uvedeno v následující tabulce:

Složka PCR směsi	Množství
10x LA polymerase buffer complete	5 µl
DMSO	1 µl
primer U515F 100 pM	0,5 µl
primer U1406R 100pM	0,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
LA polymeráza	0,2 µl
H <sub>2</sub> O bez nukleas	42 µl

Název primeru	Sekvence primeru
U515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
U1406R	GACGGGCGGTGTGTRCA

Jedná se o univerzální bakteriální primery pro amplifikaci asi 900 bp části genu SSU rDNA (Turner et al., 1999).

- Výsledný objem reakční směsi byl cca 50 µl. Všechny složky PCR směsi byly důkladně promíchány a krátce centrifugovány.
- Mikrozkumavky byly vloženy do termocycleru, na němž byly nastaveny hodnoty dle následující tabulky:

Počet cyklů	Reakce	Teplota	Doba trvání
1	Počáteční denaturace	94 °C	5 min
30	Denaturace DNA	94 °C	20 s
	Hybridizace primerů	55 °C	20 s
	Syntéza řetězce DNA	68 °C	1 min

- Po proběhnutí PCR byla amplifikovaná DNA rozdělena na agarózové gelové elektroforéze.

## 4.10 Extrakce DNA z agarózového gelu

Extrakce DNA z gelu byla provedena pomocí kitu Zymoclean Gel DNA Recovery Kit<sup>TM</sup> (Zymo Research).

- Gel byl přenesen na transluminátor a pod UV osvětlením z něj byla okamžitě vyříznuta rozdělená amplifikovaná DNA s co nejmenším podílem okolního gelu. Vyříznutý fragment byl přenesen do 1,5 ml mikrozkušavky a zvážen.
- Ke vzorku byl přidán pufr ADB Buffer<sup>TM</sup> z kitu Zymoclean<sup>TM</sup> Gel DNA Recovery Kit v trojnásobném množství vzhledem k množství gelu. Vzorek byl ponechán v tomto pufru 5–10 min při teplotě 37–55 °C dokud nebyl gel zcela rozpuštěn.
- Roztok byl přenesen do kolonky Zymo-Spin I<sup>TM</sup> Column umístěné ve sběrné mikrozkušavce.
- Vzorek byl následně centrifugován na 13 000 x g po dobu 30 s, získaný filtrát byl vylit.
- Dále bylo přidáno do kolonky 200 µl pufru Wash Buffer. Následovala centrifugace opět na 13 000 x g po dobu 30 s a filtrát byl opět vylit.
- Do kolonky bylo přidáno 15 µl sterilní vody a kolonka byla umístěna do čisté mikrozkušavky. Vzorek byl na závěr centrifugován na 13 000 x g po dobu 1 min.

## 4.11 Sekvence DNA

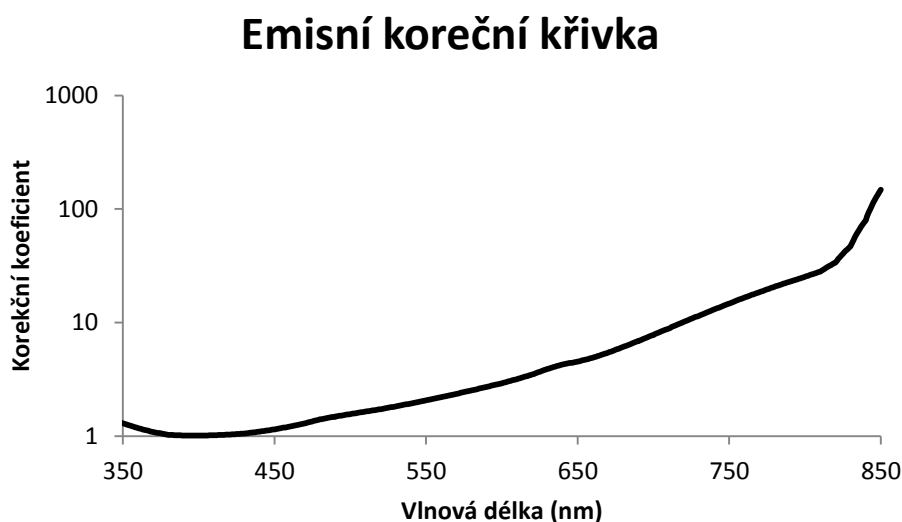
- 13 µl DNA extrahované z gelu bylo smícháno s 1 µl 4pM roztoku primeru U515F. Tatkto připravený vzorek byl odeslán na sekvenaci do Sekvenační laboratoře PřF UK, kde se využívá kapilární sekvenátor Avant 3130 Genetic Analyser.
- Výsledný chromatogram byl zkontrolován v programu Chromas Lite 2.01 a sekvence byla použita k nalezení nejbližších homologů ve veřejné databázi Gen Bank programem BLASTN (verze 2.2.26+, databáze nt/nr)

## 4.12 Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

- Jednotlivé kolonie druhu *Streptomyces durmitorensis* (MS405<sup>T</sup>) byly přeneseny do fixačního činidla 2,5% glutaraldehydu v PBS. Fixace probíhala asi 12 hodin při pokojové teplotě.
- Vzorky byly následně odvodněny vzestupnou ethanolovou řadou (koncentrace ethanolu 50%, 60%, 70%, 80%, 90% a 100%), přičemž v každém roztoku byl vzorek ponechán 15 min při pokojové teplotě.
- Sušení vzorků probíhalo v aparatuře pro vysoušení vzorků pro SEM (BAL-TEC CPD 030). Preparáty byly umístěny na vhodné nosiče a vloženy do vychlazené komory přístroje, v němž došlo k nahrazení ethanolu kapalným CO<sub>2</sub>, který se následně díky stoupající teplotě převedl do plynného stavu.
- Vysušené vzorky byly přilepeny na hliníkovou podložku oboustranně lepící uhlíkovou páskou.
- Preparát byl poté pokovován zlatem ve vakuové naprašovací aparatuře (BAL-TEC SCD 050) ve 23 °C po dobu 5 min.
- Takto připravený preparát byl vložen do skenovacího elektronového mikroskopu, záznam obrazu byl proveden pomocí softwaru SEM Control User Interface.

## 4.13 Spektrofluorometrie

Naměřená spektra byla korigována dle emisních (Graf 1) a excitačních (Graf 2) korekčních faktorů. Důvodem těchto korekcí je nerovnoměrné spektrum excitační výbojky a nedokonalosti v propustnosti monochromátorů při různých vlnových délkách.



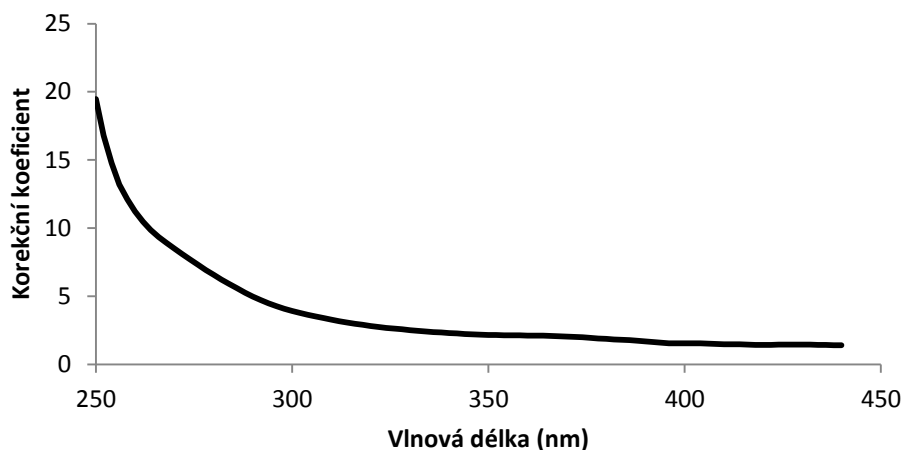
**Graf 1: Vynesení korekčních koeficientů pro emisní spektra.**

Naměřená emisní spektra byla násobena korekčními koeficienty vyneseny v tomto grafu z důvodu snížení citlivosti detektoru v delších vlnových délkách. Data byla dodána výrobcem spektrofotometru Fluoromax-3.

Tyto emisní korekční koeficienty (Graf 1) byly získány z manuálu od výrobce spektrofotometru Fluoromax-3. Všechna data naměřená na tomto spektrofotometru byla těmito korekčními koeficienty vynásobena.

Excitační korekční koeficienty byly získány měřením intenzity světla samotné lampy v rozsahu vlnových délek 250–600 nm. Pro účely studia fluorescenčních charakteristik DDHR byl dostačující rozsah 250–450 nm (Graf 2). Hodnoty intenzity lampy se mohou v čase nepatrně měnit, proto je vhodné měřit intenzitu lampy při každé sérii měření. Všechna naměřená data byla těmito korekčními faktory vynásobena.

## Excitační korekční křivka



**Graf 2: Vynesení korekčních koeficientů pro excitační spektra.**

Naměřená excitační spektra byla násobena korekčními koeficienty vyneseny v tomto grafu. Závisí na aktuálním spektru světelného zdroje, které se může v čase mírně lišit. Tyto drobné odchylky však mají na tvar spektra jen minimální vliv.

Hodnoty byly normalizovány na maximum podle vzorce:

$$Xi = \frac{Ai}{A_{\max}}$$

kde  $X_i$  je normalizovaná hodnota,  $A_i$  je naměřená intenzita fluorescence pro konkrétní vlnovou délku a  $A_{\max}$  je maximální naměřená hodnota intenzity fluorescence. Měření DDHR v koncentracích nad 50  $\mu\text{M}$  není možné z důvodu tzv. „vnitřního filtru“, tedy jevu, kdy látka ve vysoké koncentraci absorbuje velkou část excitačního záření, které vstupuje do kyvety. Na detektor se pak tedy dostává nedefinované množství světla. DDHR bylo tedy před měřením naředěno na koncentraci nižší a zároveň byla absence vnitřního filtru potvrzena vizuální kontrolou, tak i postupným ředěním vzorku a měřením intenzity fluorescence, dokud pokles intenzity fluorescence nebyl lineární s poklesem koncentrace. Molekuly DDHR nebyly excitovány v excitačním maximu kvůli vysoké absorpci záření v této oblasti.

### 4.13.1 Měření fluorescenčních spekter DDHR v rozpouštědlech

Excitační a emisní spektra DDHR byla měřena v těchto rozpouštědlech:

- Voda (destilovaná)
  - Ethanol (96%)
  - DMSO
  - Chloroform
  - Benzen
  - Hexan
  - Dekan
- DDHR bylo do 2ml kyvet přidáváno v objemu 2 $\mu$ l ze zásobního roztoku v DMSO (10 mg/ml). Koncentrace DDHR byla tedy asi 14 $\mu$ M. Měření probíhalo na spektrofleurometru Fluoromax-3. Záznam dat byl proveden pomocí softwaru DataMax, zpracování dat pomocí softwaru Microsoft Excel. Měření probíhalo za pokojové teploty 25 °C. Štěrbiny byly nastaveny na hodnotu 5 nm. Integrační čas byl 0,05–0,5 s.
  - Excitační spektra v uvedených rozpouštědlech byla měřena při emisi 540 nm v rozsahu 240–430 nm. Emisní spektra byla měřena při excitaci 340 nm v rozsahu vlnových délek 380–700 nm. Žádný filtr nebyl použit.
  - Spektra byla korigována dle korekčních koeficientů z oddílu 4.13 a normalizována na maximum. Od spekter DDHR byl vždy odečten slepý vzorek (blank) konkrétního rozpouštědla.

### 4.13.2 Měření závislosti fluorescence DDHR na pH

- Emisní spektrum 7 $\mu$ M DDHR (připravené ze zásobního roztoku v DMSO v koncentraci 20 mg/ml) bylo měřeno v 3ml kyvetách v pufru TBS na spektrofleurometru Fluoromax-3 (záznam dat pomocí softwaru DataMax, zpracování softwarem Microsoft Excel). Integrační čas byl nastaven na hodnotu 0,1 s a štěrbiny na 5 nm. Měření probíhalo v křemenné kyvetě za pokojové teploty 25 °C.

- Emisní spektrum bylo měřeno při excitaci 370 nm v rozsahu 390–700 nm. Při měření byl použit optický filtr LP405 („long pass“ filtr, který nepropouští kratší vlnové délky než 405 nm), aby bylo zamezeno záznamu nežádoucích rozptylů na různých nečistotách.
- K roztoku DDHR v TBS bylo postupně přidáváno určité množství 2M NaOH nebo 1M HCl (2–20  $\mu$ l). Ke stanovení pH v kyvetě bylo odebráno vždy 20  $\mu$ l roztoku a změřeno na přenosném pH metru. Pro ověření, zda přítomnost molekul NaOH nebo HCl nevykazuje další fluorescence, byly změřeny i pro vzorky TBS/NaOH a TBS/HCl. Bylo zjištěno, že spektrum takových roztoků je prakticky totožné s blankem (pufr TBS), tudíž přítomnost molekul NaOH nebo HCl neovlivňuje měřená fluorescenční spektra vlastní fluorescencí.
- Naměřená spektra byla korigována dle korekčních koeficientů uvedených v oddíle 4.13. Od naměřených spekter byl vždy odečten slepý vzorek (blank) TBS.

#### **4.13.3 Měření závislosti fluorescence DDHR na jeho koncentraci**

- Spektra 7 $\mu$ M a 28 $\mu$ M DDHR (namíchané za zásobního roztoku v DMSO v koncentraci 20 mg/ml) bylo měřeno v 3ml kyvetách v pufru TBS na spektrofluorometru Fluoromax-3 (záznam dat pomocí softwaru DataMax, zpracování softwarem Microsoft Excel). Integrovaný čas byl nastaven na hodnotu 0,1 s a šterbiny na 5 nm Měření probíhalo za pokojové teploty 25 °C.
- Emisní spektrum bylo měřeno při excitaci 370 nm v rozsahu 390–700 nm.
- Naměřená spektra byla korigována dle korekčních koeficientů uvedených v oddíle 4.13. Od naměřených spekter byl odečten blank TBS.



#### 4.13.4 Měření emisního spektra DDHR v liposomech

- Liposomy byly připraveny dle postupu uvedeného v oddíle 4.14.
- Spektra byla měřena pomocí spektrofleurometru Fluoromax-3, záznam dat byl proveden softwarem DataMax, zpracování dat softwarem Microsoft Excel. DDHR bylo přidáváno k liposomům v koncentraci 35  $\mu\text{M}$ . Štěrbina u detektoru byla nastavena na hodnotu 5 nm, integrační čas 0,1 s. Měření bylo prováděno při teplotě 25 °C v křemenné kyvetě.
- Emisní spektrum liposomů v TBS značených DDHR bylo měřeno při excitaci 370 nm. Spektrum bylo měřeno v rozsahu emisního spektra DDHR 390–700 nm. Při měření byl používán optický filtr LP405.
- Všechna emisní spektra byla korigována dle korekčních faktorů z oddílu 4.13. Od naměřených spekter byl vždy odečten blank liposomů v pufru TBS.

#### 4.13.5 Měření fluorescenčních spekter buněk Jurkat značených DDHR

- Buňky Jurkat byly odebrány z kultivační nádoby a pomocí centrifugace (5 min, 200 x g) zbaveny média RPMI 1640. K buňkám bylo následně přidáno médium HBSS (bezfosfátové médium) s 20 $\mu\text{M}$  DDHR. Inkubace buněk s DDHR probíhala po dobu 10 minut v pokojové teplotě. Pro tato měření nemohlo být použito médium RPMI 1640, ve kterém se standardně buňky Jurkat kultivují, kvůli vlastnímu fluorescenčnímu pozadí.
- Buněčná suspenze byla po inkubaci centrifugována (5 min, 200 x g), HBSS bylo odstraněno a buňky byly resuspendovány v čistém médiu HBSS, ve kterém měření probíhalo.
- Měření probíhala na spektrofleurometru Fluoromax-3. Záznam dat byl proveden softwarem DataMax a zpracování softwarem Microsoft Excel. Měření probíhalo v 60 $\mu\text{l}$  křemenné kyvetě za pokojové teploty 25 °C. Integrační čas byl 0,05 s. Štěrbiny byly nastaveny na hodnotu 5 nm.

- Emise byla měřena v rozsahu vlnových délek 380–700 nm při excitaci vlnovými délkami 300 nm, 320 nm, 340 nm a 360 nm (pro zpracování byla vybrána pouze jedna excitační vlnová délka - 340 nm). Fluorescence byla měřena za použití filtru LP405 („long pass“ filtr, který nepropouští kratší vlnové délky než 405 nm) pro eliminaci rozptylu suspenze buněk. Excitační spektra byla měřena v oblasti vlnových délek 300–405 nm při emisní vlnové délce 540 nm.
- Všechna emisní spektra byla korigována dle korekčních faktorů z oddílu 4.13 a normalizována na maximum. Od naměřených spekter byl vždy odečten blank HBSS nebo HBSS s neznačenými buňkami.

## 4.14 Příprava multilamelárních liposomů

Liposomy představují jeden z membránových modelů vhodných pro studium látek interagujících s buněčnými membránami. Liposomy byly připraveny metodou hydratace suchého fosfolipidového filmu. Tato metoda je jednou z nejstarších a nejpoužívanějších metod přípravy multilamelárních liposomů.

- Do jednotlivých zábrusových zkumavek byly naváženy tyto lipidy: dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC), dimyristoylfosfatidylcholin (DMPC), cholesterol a ergosterol.
- Jednotlivé typy lipidů byly rozpuštěny v chloroformu na výslednou koncentraci 10 mg/ml a smíchány tak, aby liposomy obsahovaly DPPC a DMPC v poměru 1:1. Ke vzorkům, ze kterých měly být připraveny liposomy se steroly, byl ke směsi DPPC:DMPC 1:1 cholesterol, nebo ergosterol tak, aby jeho výsledný obsah byl 10% (w/v).
- Jednotlivé vzorky byly v zábrusových zkumavkách protřepány, chloroform byl následně odpařen v proudu dusíku tak, aby na stěnách zkumavky ulpěl co nejtenčí lipidový film
- Odparky byly poté vytřepány v pufru TBS po dobu asi 3 minut – zakalení pufru svědčí o přítomnosti liposomů. Výsledná koncentrace lipidů v pufru byla 1 mg/ml.

## 4.15 Měření stability fluorescence

Stabilita fluorescence neboli kinetika vysvěcování fluorescence byla měřena na konfokálním mikroskopu Leica SP2. Celkem byly připraveny tři vzorky:

- Fixované buňky (oddíl 4.6) značené DDHR a zalité do Mowiolu.
  - Fixované buňky značené DDHR a zalité do Mowiolu s 10mM kyselinou askorbovou.
  - Mycelium *Streptomyces durmitorensis* zalité do Mowiolu.
- 
- Na konfokálním mikroskopu byla nastavena intenzita laseru 5 %, což odpovídá asi 0,0225 mW. Během měření všech tří vzorků nebyly parametry mikroskopu měněny. Vysvěcování fluorescence bylo měřeno po dobu asi 26 minut skenováním obrazu s frekvencí cca 1 snímek za sekundu. Záznam obrazu byl proveden pomocí softwaru Leica Confocal Software, vyhodnocení softwarem ImageJ.

## 4.16 Spektrofotometrické měření nárůstu mikrobiálních kultur

- Buňky z třepaných kultur v tekutém médiu (starter) byly zaočkovány na optickou denzitu 0,1 do 100ml Erlenmeyerových baněk obsahující 12 ml tekutého média YPAD (kvasinky) nebo LB média (bakterie) s přidavkem makrolidů filipinu nebo DDHR (v zásobním roztoku DMSO) v koncentracích 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M a 20 $\mu$ M. Do jedné baňky bylo přidáno pouze DMSO ve stejném objemu jako byl objem DMSO přidáný v nejvyšší koncentraci DDHR. Tento vzorek sloužil jako kontrola.

- Z třepaných kultur bylo v určitých intervalech (1 h pro kvasinky, 30 min pro bakterie) odebráno do plastové 1cm kyvety 800  $\mu$ l suspenze a na spektrofotometru změřena absorbance vzorku při  $\lambda = 600$  nm proti blanku (samotnému médiu). Po dosažení absorbance 0,7 byly vzorky ředěny médiem 2krát případně 4krát. Každý vzorek byl změřen dvakrát. Hodnota aritmetického průměru byla vynesena do grafu růstových křivek.

## **4.17 Sledování toxicity na savčí buňky pomocí LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit**

### **4.17.1 Značení suspenzních buněk Jurkat pro průtokovou cytometrii**

- Buňky o denzitě  $10^6$  buněk/ml byly z kultivační nádoby přeneseny do 12jamkové destičky, kde byly kultivovány v médiu RPMI 1640 s různými koncentracemi DDHR v inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> po dobu 2 h.
- Z buněk bylo centrifugací (3 min, 400 x g) odstraněno médium a nahrazeno předeřátým PBS.
- Buňky byly vneseny do 96jamkové destičky po 100 $\mu$ l.
- Do každé jamky byl přidán kalcein AM a EthD-1 na výslednou koncentraci 4 $\mu$ M pro kalcein AM a 2 $\mu$ M pro EthD-1. Tento krok byl prováděn na vyhřívané destičce.
- Buňky byly s oběma činidly inkubovány 15 minut v termostatickém inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Po skončení inkubace byly suspenzní buňky ihned změřeny na průtokovém cytometru BD LSRII s využitím modulu HTS.

#### **4.17.2 Značení adherentních primárních kožních fibroblastů pro průtokovou cytometrii**

- Buňky byly napěstovány do 12 jamkové destičky a kultivovány v médiu DMEM s různými koncentracemi DDHR v inkubátoru při 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> po dobu 2 h.
- Po inkubaci bylo z buněk odstraněno médium (uchováno v mikrozkuhavce zvlášť pro zachování mrtvých buněk po působení DDHR) a nahrazeno 0,5 ml 1x trypsinem s EDTA, které bylo na buňkách ponecháno asi 10 min za občasné kontroly pod mikroskopem.
- Po uvolnění buněk ze dna kultivačních jamek byly buňky staženy Pateurovou pipetou a přeneseny do mikrozkuhavky s médiem DMEM pro zastavení aktivity trypsinu.
- Následně byly buňky i uchované médium centrifugovány (3 min, 400 x g) a naředěny PBS. Zpracované médium bylo spojeno s buňkami, od kterých bylo na počátku odebráno.
- Vzorky byly přeneseny do 96jamkové destičky, a značeny 4μM kalceinem AM a 2μM EthD-1. Tento krok byl prováděn na vyhřívané destičce.
- Buňky byly s oběma činidly inkubovány 10 minut v termostatickém inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Po skončení inkubace byly suspenzní buňky ihned změřeny na průtokovém cytometru BD LSRII s využitím modulu HTS.

Manipulace s buňkami kromě inkubace kitem LIVE/DEAD<sup>®</sup> byly prováděny na ledu kvůli eliminaci vstupu buněk do apoptózy. Záznam měření byl proveden softwarem FACSDiva. Kalcein byl excitován při 488 nm (použit filtr 535/50, 505LP) – kanál pro A488. EthD-1 byl excitován 561 nm (použit filtr 610/20, 600LP) – kanál pro A594. Vyhodnocení dat bylo provedeno softwarem GateLogic.

#### **4.17.3 Značení HeLa buněk pro mikroskopii**

- Buňky napěstované do 12jamkové destičky v médiu DMEM byly inkubovány 2 h s různými koncentracemi DDHR.

- Po skončení inkubace bylo Pasteurovou pipetou odstraněno médium a nahrazeno přehřátým PBS. Do každé jamky byl přidán 4 $\mu$ M kalcein AM a 2 $\mu$ M EthD-1.
- Buňky byly ponechány si 20 minut v termostatickém inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) a ihned poté mikroskopovány fluorescenčním mikroskopem Olympus IX71.

## 4.18 Detekce buněčné apoptózy pomocí Apoptosis Assay Kit

- Pro detekci apoptózy bylo množství 10<sup>6</sup> buněk/ml přidáno po 100–200  $\mu$ l do 96 jamkové destičky a centrifugováno na chlazené centrifuze s rotorem určeným pro centrifugaci destiček (110 x g, 5 min, 4 °C).
- Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány ve 100 $\mu$ l pufru Annexin-V binding buffer. Poté bylo do jamek přidáno 5  $\mu$ l Annexin-V (Alexa Fluor 647 nebo FITC) a 5 $\mu$ l DAPI nebo PI (koncentrace 1 mg/ml) ve vhodných kombinacích. Následovala 15minutová inkubace při pokojové teplotě ve tmě.
- Po inkubaci byly buňky centrifugovány (110 x g, 5 min, 4 °C) a promyty 100 $\mu$ l pufru Annexin-V binding buffer. Tento krok byl ještě jednou zopakován. Takto připravené buňky byly analyzovány na průtokovém cytometru BD LSRII s využitím modulu HTS (High Throughput Sampler).

Všechny kroky vyjma barvení Annexinem-V a propidium jodidem (PI) nebo DAPI byly prováděny na ledu. Pro záznam měření byl použit software FACSDiva.

- Annexin-V byl excitován 633 nm (použit filtr 660/20) - kanál A647.
- DAPI bylo excitováno 407 nm (použit filtr 450/50) - kanál DAPI.
- DDHR bylo excitováno 407 nm (použit filtr 525/50, 475LP) - kanál Cascade Yellow.
- PI bylo excitováno 561 nm (použit filtr 610/20, 600LP) - kanál A594.
- FITC bylo excitováno 488 nm (použit filtr 535/50, 505LP) - kanál A488.

Vyhodnocení dat bylo provedeno softwarem FlowJo nebo GateLogic.

## 4.19 Agarózová gelová elektroforéza

- Pro přípravu agarózového gelu byla použita 1% (w/v) agaróza v pufru 1x TBE. Agaróza byla zahřívána za občasného důkladného míchání v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění.
- Roztok byl následně ochlazen pod vlažnou tekoucí vodou na přibližně 60 °C. Po ochlazení byla k roztoku přidána červeň GelRed Nucleid Acid (ředění 10 000x).
- Po důkladném promíchání byl roztok nalit do předem připravené elektroforetické vaničky s hřebínkem a ponechán ve vodorovné poloze asi 1 h při pokojové teplotě ztuhnout. Před vlastním nanášením vzorků byl z gelu opatrně odstraněn hřebínek.
- Gel byl následně vložen do elektroforetické komory a zalit 1x TBE pufrem. Vzorky byly smíchány s 4x vzorkovým pufrem (BFM) v poměru 1:3 a nanесeny do jednotlivých jamek.
- Elektroforéza probíhala při napětí 18 V/cm délky gelu, dokud čelo nedoputovalo k okraji.
- Gel byl následně přenesen na UV transluminátor. Záznam gelu byl snímán CCD kamerou Exwave HAD pod UV světlem. Úprava jasu a kontrastu byla provedena v aplikaci QuickPHOTO MICRO.

## 4.20 Příprava černých lipidových membrán

Měření byla provedena ve spolupráci s RNDr. Radovanem Fišerem, Ph.D. na sestavené aparatuře pro měření vodivosti černých lipidových membrán. Záznam vodivosti byl proveden pomocí softwaru BLM2.

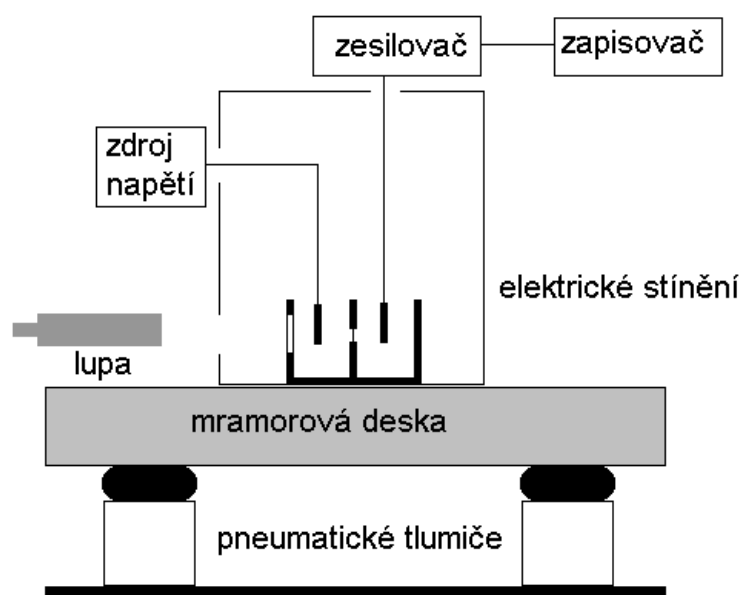
- Všechny nádoby, do kterých byly lipidy odvažovány nebo ve kterých byly míchány, byly nejdříve vymyty chloroformem a ponechány vyschnout.
- Sojové azolipidy (24 % nasycených, 14 % mononenasycených a 62 % polynenasycených mastných kyselin, majoritní zastoupení fosfatidylcholinu) nebo cholesterol byly odváženy do skleněných vialek a rozpuštěny ve směsi

n-dekan : butanol v poměru 9:1. Výsledná koncentrace azolipidů byla 3% (w/v). Ve stejné směsi rozpouštědel byl rozpuštěn i cholesterol, který byl přidán k odebrané části již namíchaných azolipidů tak, aby jeho výsledný obsah byl molárních 30 %. Poměr azolipidů:cholesterolu byl tedy 2:1. Lipidy byly protřepány a dobře uzavřeny.

- Dvoudílná měřicí teflonová kyvetka s prosklenou čelní stěnou pro snadnou kontrolu stavu membrány byla důkladně opláchnuta chloroformem a ponechána vyschnout. Kruhový otvor v přepážce pro membránu o ploše asi 1 mm<sup>2</sup> byl potřen roztokem azolipidů v chloroformu (s nedefinovaným množstvím rozpuštěných azolipidů) a opět ponechán důkladně vyschnout.
- Obě měřicí komůrky byly naplněny 2 ml pufru s 1M KCl a vloženy do aparatury na měření elektrické vodivosti membrán. Do každé komůrky byla ponořena jedna argento-chloridová elektroda – anoda do cis části kyvety, katoda do trans části kyvety.
- Na špendlíkovou hlavičku bylo nanесeno cca 2 μl roztoku azolipidů v rozpouštědlech dekan/butanol a pomocí něj byla v otvoru mezi komůrkami vytvořena umělá membrána. Kontrola tvorby membrány a její ustálení na dvojvrstvu byla prováděna při chodu aparatury sledováním záznamu elektrické vodivosti (a jejího šumu) pomocí softwaru BLM2.

Pro potřeby vkládání napětí na membránu byly použity suché články s odporovým děličem. Aparatura byla položena na těžké mramorové desce ležící na vzduchovém odpružení a od okolního prostředí byla elektricky odstíněna (Obr. 14). Všechna měření byla prováděna při pokojové teplotě.





**Obr. 14:** Schéma aparatury používané při měření elektrické vodivosti černých lipidových membrán.

(Převzato z diplomové práce RNDr. Radovana Fišera, Ph.D.).

## 4.21 Měření elektrické vodivosti černých lipidových membrán

- Pro sledování vlivu DDHR na elektrickou vodivost umělé membrány byla použita aparatura, jejíž schéma je uvedeno v oddílu 4.20 (Obr. 14).
- Proud protékající elektrodami byl převáděn na zaznamenatečné napětí operačními zesilovači (LCA, Femto) v poměru  $10^8:1$  nebo  $10^{10}:1$  V/A. Zesílený signál byl digitalizován A/D kartou KPCI-3101 (Keithly) s frekvencí odečtu 2000 kHz. Měření byla provedena při napětí 75 mV při pokojové teplotě. Záznam vodivosti membrány byl prováděn pomocí programu BLM2. Záznamy byly pořizovány v minimální délce 10 minut od tvorby nové membrány. Měření byla celkem 3x opakována pro každou koncentraci DDHR vždy spojená s tvorbou nové membrány.

Výpočet vodivosti ( $G$ ) membrán či membránových poruch (kanálů) byl proveden podle vzorce:

$$G = \frac{I}{U} = \frac{I_k - I_b}{U}$$

Kde  $I_k$  je proud procházející otevřeným kanálem,  $I_b$  je proud procházející neporušenou membránou a  $U$  je napětí na membráně (75 mV). Vyhodnocení dat bylo provedeno softwarem QuB.

## 4.22 Nukleární magnetická rezonance (NMR)

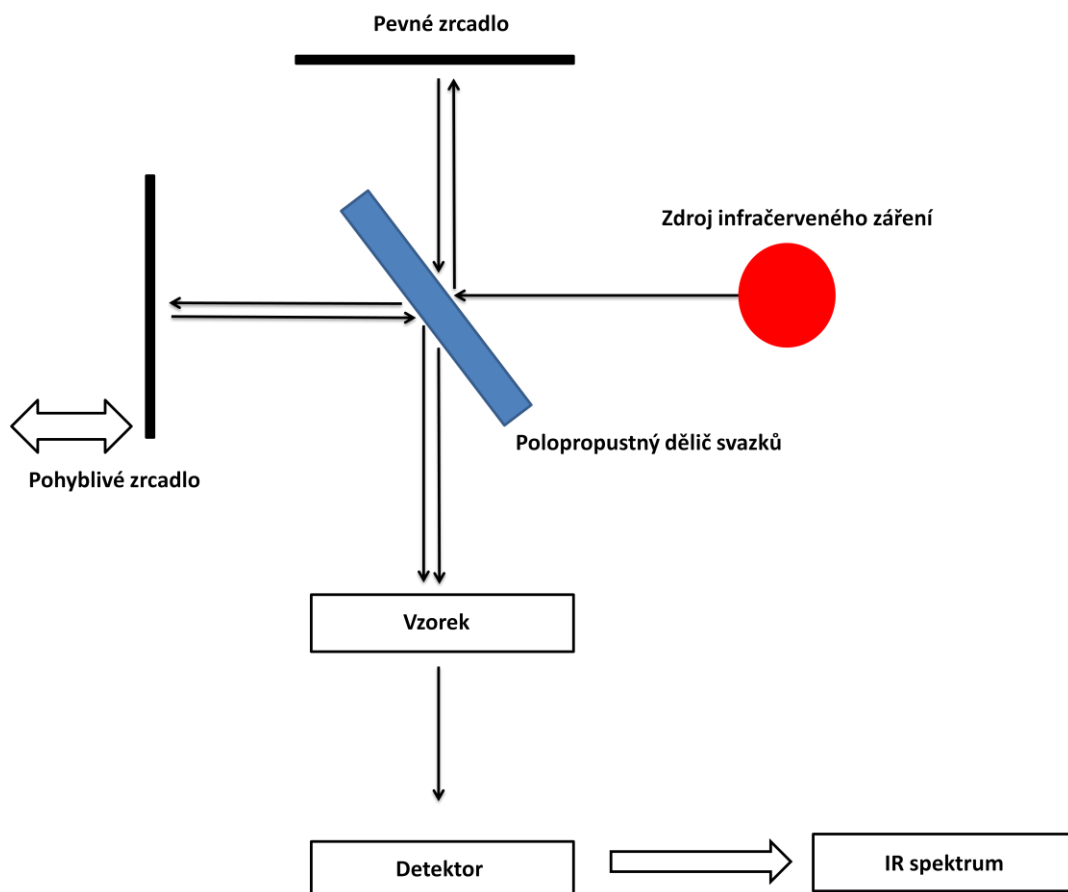
Experimenty byly provedeny na spektrometru ULTRASHIELD™ PLUS 600 MHz (Bruker) ve spolupráci s RNDr. Zdeňkem Tošnerem, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Všechna měření byla prováděna při pokojové teplotě. Vzorky byly připraveny tímto způsobem:

- První vzorek byl připraven rozpuštěním práškového DDHR v deuterovaném methanolu ( $CD_3OD$ ) na výslednou koncentraci 10,2 mM. Druhý vzorek byl připraven rozpuštěním cholesterolu také v deuterovaném methanolu na výslednou koncentraci 10,2 mM. Třetí vzorek byl připraven smícháním připravených vzorků cholesterolu a DDHR v ekvimolárním poměru na výslednou koncentraci 5,1 mM.
- Pro ověření struktury DDHR uvedené v publikaci Stodůlková et al. (2011) bylo pro DDHR změřeno  $^1H$  spektrum NMR, stejně tak i kontrolní spektrum cholesterolu v deuterovaném methanolu. Pro detekci interakce DDHR s cholesterolem bylo naměřeno pro směs DDHR a cholesterol spektrum  $^1H$  NMR a 2D-DOSY. Měření probíhala pomocí softwaru Topspin 1.3.

## 4.23 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR)

Experimenty byly provedeny na FT-IR spektrometru Vector 33 (Bruker) ve spolupráci s RNDr. Vladimírem Kopeckým, Ph.D. z Fyzikálního ústavu Matematicko-fyzikální fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Měření byla provedena při teplotě 20 °C, aparatura byla profukována sušeným vzduchem s relativní vlhkostí méně než 1 %. Zdrojem infračerveného záření byl Globar (SiC), záření následně procházelo aperturou 1,4 mm a dopadalo na dělič svazku z KBr. Jako detektor byl použit polovodičkový detektor MCT D315 chlazený kapalným dusíkem. Vzorky byly připraveny tímto způsobem:

- Pevný SDS byl rozpuštěn v deionizované vodě na výslednou koncentraci 80 mM (kritická micelární koncentrace SDS ve vodě při 25 °C je 8 mM) a protřepán.
- První vzorek byl připraven rozpuštěním práškového cholesterolu v roztoku 80mM SDS o konečné koncentraci 40 mM. Do další mikrozkušavky byl rozpuštěn práškový DDHR v roztoku 80 mM SDS o konečné koncentraci 40 mM. Třetí vzorek byl připraven jako směs cholesterolu a DDHR v ekvimolárním poměru v roztoku 80mM SDS. Konečná koncentrace cholesterolu i DDHR ve směsi byla 40 mM. Všechny vzorky byly důkladně protřepány.
- Vzorky byly měřeny v transmisním uspořádání v 8 $\mu$ m CaF<sub>2</sub> kyvetách v oblasti 4000–600 cm<sup>-1</sup> při 4000 skenech s použitím apodizační funkce Blackman-Harris 3-term a fázové korekce podle Mertze. Prodleva před každým měřením byla nastavena na 5 minut, aby došlo k důkladnému profukování aparatury po otevření vzorkového prostoru při výměně vzorku.
- Infračervená spektra byla naměřena pomocí programu OPUS a zpracována v softwaru GRAMS/32 AI.



**Obr. 15: Schéma FT-IR spektrometru.**

Ze zdroje infračerveného záření vychází paprsek, dopadá na polopropustný dělič svazků z KBr, kde je polovina záření odražena na pevné zrcadlo, od kterého se vrací zpět, druhá polovina prochází děličem svazků a je odražena zpět pohyblivým zrcadlem. Oba svazky se setkávají a dochází k jejich rekombinaci a interferenci. Po průchodu vzorkem dopadají na detektor. Získaný interferogram je převeden Fourierovou transformací na infračervené spektrum.

## 5 Výsledky

### 5.1 Morfologie druhu *Streptomyces durmitorensis*

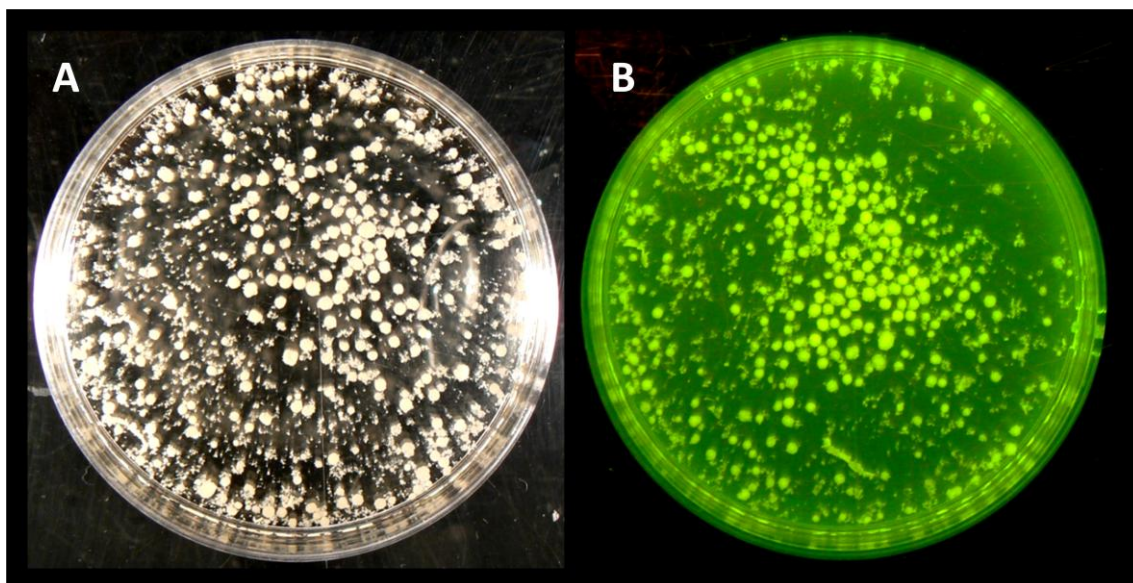
Streptomycety jsou vláknité bakterie, které typem, strukturou a uspořádáním kolonií připomínají houby. Tvoří dva typy mycelií: primární (vegetativní) mycelium a sekundární (vzdušné) mycelium. Na sekundárním myceliu se tvoří spory nazývané konidie.

Streptomycety citlivě reagují na okolní prostředí a jeho změny, přičemž kolonie jednoho druhu mohou být velmi variabilní v závislosti na charakteru substrátu.

Vzhledem k tomu, že je *Streptomyces durmitorensis* poměrně nedávno izolovaný a neprostudovaný druh, byly jeho kolonie podrobeny detailnějšímu pozorování. Pro studium morfologie tohoto druhu v různých podmínkách (kultivované na pevných agarových půdách nebo v třepáných kulturách) byla využita fluorescenční binolupa, fotoaparát Panasonic s UV filtrem a skenovací elektronový mikroskop.

#### 5.1.1 Bakterie *Streptomyces durmitorensis* kultivovaná v tekutém LB médiu

Kultivace *Streptomyces durmitorensis* v tekutém médiu v třepané kultuře v 30 °C vede po cca 5 dnech k tvorbě kulovitých kolonií s průměrem 0,5–2 mm bíložluté barvy. Část kultury inkubované v těchto kultivačních podmínkách 5 dní byla vyfotografována ve viditelném světle (Obr. 16 A) a pod UV světlem na UV transluminátoru (Obr. 16 B).



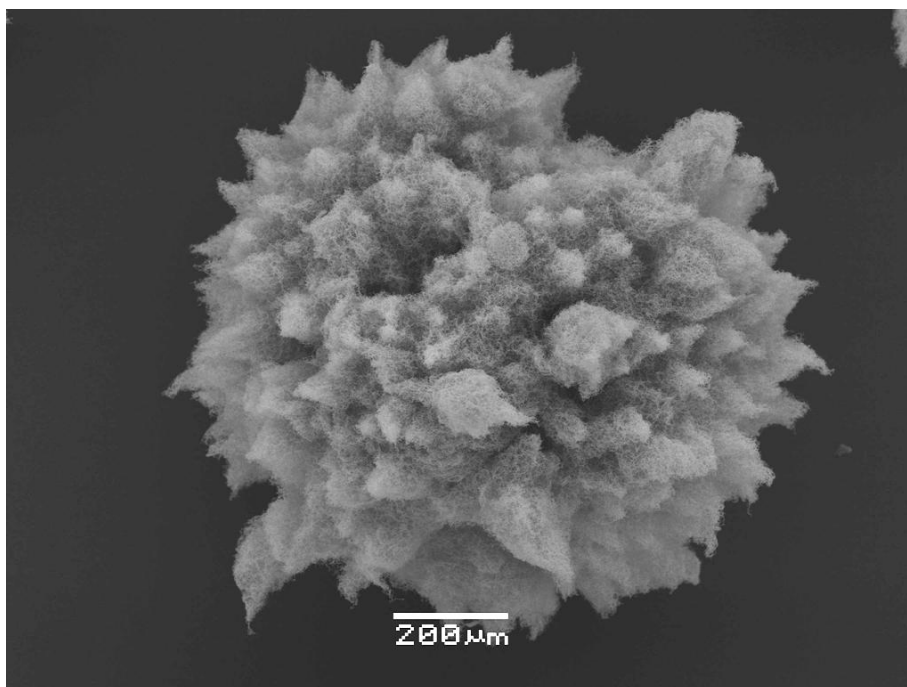
**Obr. 16: Snímky kolonií *Streptomyces durmitorensis* kultivované v třepané kultuře.**

Bakterie byly kultivovány v tekutém LB médiu a vyfotografovány v Petriho misce o průměru 5 cm. Snímky byly pořízeny při osvětlení lampou s polychromatickým světlem (A), pod osvětlením UV světlem (B). Na snímcích jsou patrné četné kulovité kolonie, které při osvětlení UV světlem emitují fluorescenční signál. Fluorofor je produkován také do okolního média (fotoaparát Panasonic).

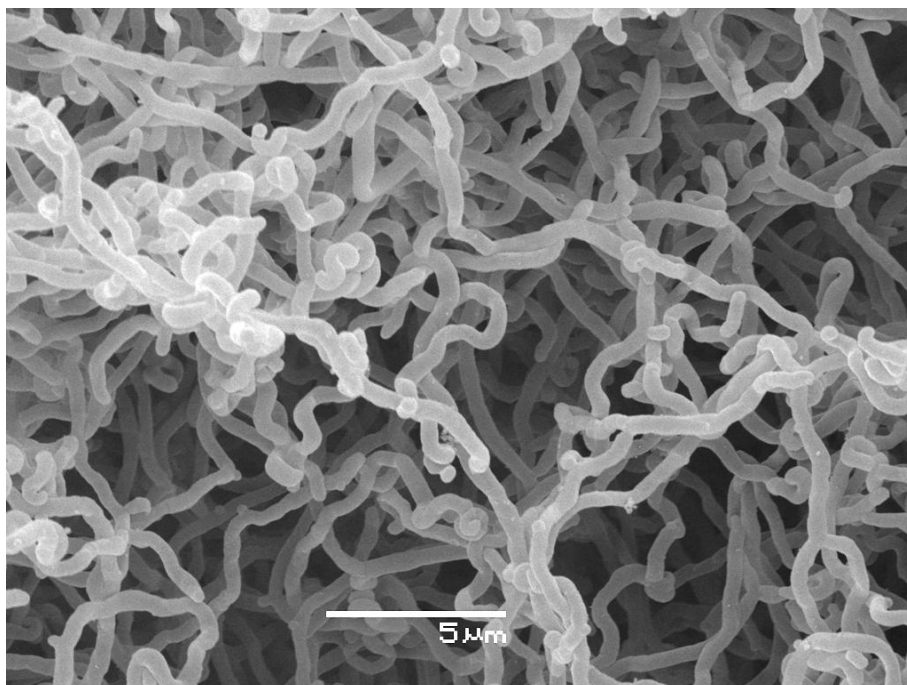
*Streptomyces durmitorensis* třepané v LB médiu při 30 °C vytváří četné kulovité kolonie (Obr. 16 A). Bakterie produkují fluorescenční metabolit v poměrně velkém množství do okolního média, významná část fluorescenční látky je lokalizována dle obrázku také v koloniích bakterií (Obr. 16 B).

Pro zjištění povrchové struktury kolonií druhu *Streptomyces durmitorensis* a zobrazení povrchových detailů při vyšším zvětšení byl použit také skenovací elektronový mikroskop. Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) je typ zobrazovací techniky s vysokým rozlišením. Umožňuje studovat ultrastrukturu mnoha objektů pomocí elektronového svazku ve vakuu. Elektrony zaostřené elektromagnetickými čočkami dopadají na povrch sledovaného vzorku a indukují tak emisi sekundárních elektronů ze vzorku. Tyto elektrony poté dopadají na detektor a signál je zpracován do obrazu. Pohyb svazku elektronů po vzorku umožňuje skenovat vybranou oblast vzorku. Výsledné snímky zachycují povrchovou strukturu sledovaných preparátů.

Z třepaných kultur bylo odebráno několik kolonií, které byly připraveny pro pozorování na SEM.



**Obr. 17:** Kolonie *Streptomyces durmitorensis* kultivované v třepané kultuře v tekutém LB médiu. Kolonie jsou charakteristické svým kulovitým tvarem s četnými výběžky (SEM, zvětšení 80x).



**Obr. 18:** Kolonie *Streptomyces durmitorensis* kultivované v třepané kultuře v tekutém LB médiu. Na snímku jsou patrná jednotlivá vlákna mycelia bez zřetelné tvorby spor (SEM, zvětšení 5000 x).

Skenovací elektronový mikroskop odhalil detailněji povrchovou strukturu kulovitých kolonií. Kolonie kultivované v třepané kultuře mají tvar téměř pravidelné koule s velmi členitým povrchem se zašpičatělými výběžky směřujícími do média (Obr. 17). Kulovité útvary kolonií jsou stabilní a během kultivace ani manipulace se nerozpadají.

Větší zvětšení (Obr. 18) odhalilo jemnou vláknitou strukturu.

Při 5000x zvětšení lze jasně rozeznat jednotlivá vlákna mycelia. Jedná se o vícebuněčné hyfy, které se prodlužují růstem v terminálních částech. Na pozorovaném myceliu není patrná tvorba spor.

### 5.1.2 Bakterie *Streptomyces durmitorensis* kultivovaná na pevných agarových půdách

Morfologie kolonií streptomycet rostlých na pevné agarové půdě se od těch, které rostly v třepané kultuře, velmi odlišuje.

Bakterie *Streptomyces durmitorensis* byly zaočkovány do pevného NE média, kultivovány 14 dní při 28 °C a následně uchovány cca 6 měsíců v lednici při 5 °C.

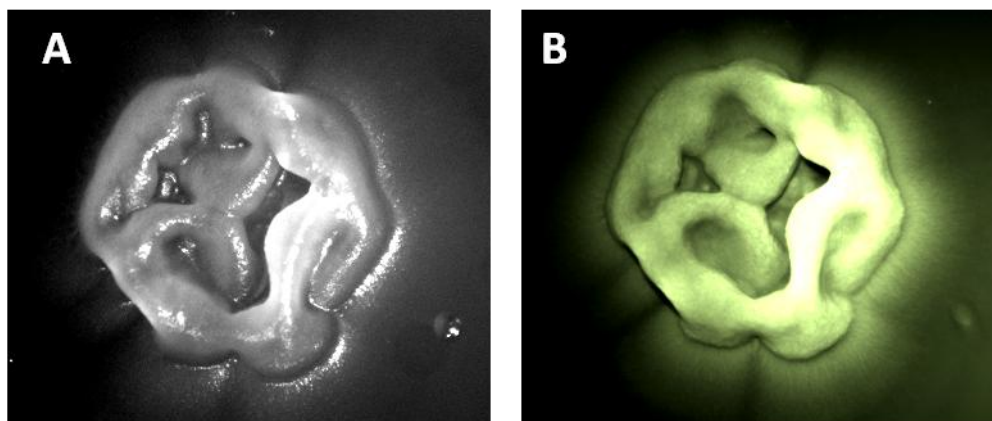
Bakterie narostlé na pevné agarové půdě tvoří lamelární kolonie s komplexní strukturou. Obecně je možné pozorovat prstenec lamel, který je zprohýbán s občasnými radiálními výběžky (Obr. 19, Obr. 20). Při pozorování fluorescenční binolupou byla možné vidět homogenní distribuci fluorescenčních metabolitů v koloniích bez zjevné buněčné specializace pro produkci fluorescenčních sekundárních metabolitů v rámci kolonie (Obr. 19 B).

Pro získání větších detailů morfologie kolonií rostoucích na pevném médiu bylo opět provedeno pozorování pomocí skenovacího elektronového mikroskopu.

Větší zvětšení (9000x) odhalilo jemnou strukturu vláknitého mycelia (Obr. 21). Na rozdíl od hyf kultury kultivované v tekutém médiu je zřejmé, že vlákna jsou kratší a více kompaktní.

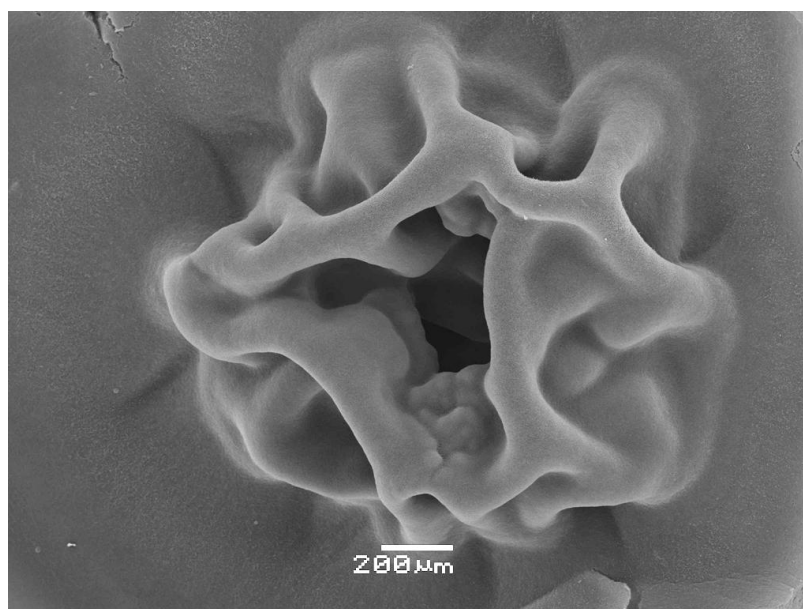
Pro porovnání struktury mladých kolonií s 6 měsíců starou kulturou byly bakterie zaočkovány na pevnou LB půdu 10 dní před pozorováním a uchovávána v teplotě 23 °C.





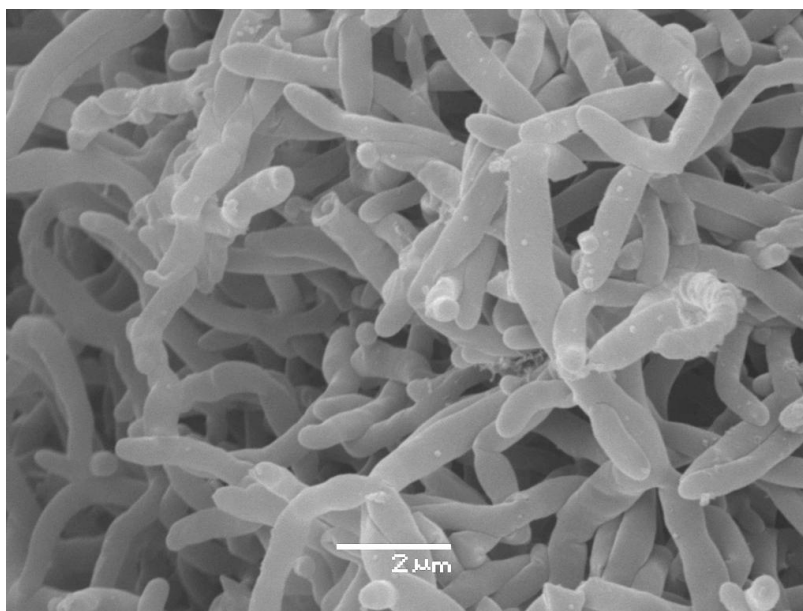
**Obr. 19:** Kolonie *Streptomyces durmitorensis* narostlé na pevném NE médiu.

Snímek pořízený pod osvětlením lampou s polychromatickým bílým světlem (A), snímek kolonie pod UV osvětlením ve fluorescenčním módu (B). Streptomycety tvoří charakteristické lamelární kolonie. (Fluorescenční binolupa, objektiv 0,8x).



**Obr. 20:** Kolonie *Streptomyces durmitorensis* rostlé na pevné NE půdě.

Vytvořena charakteristická lamelární kolonie (SEM, zvětšení 55x).



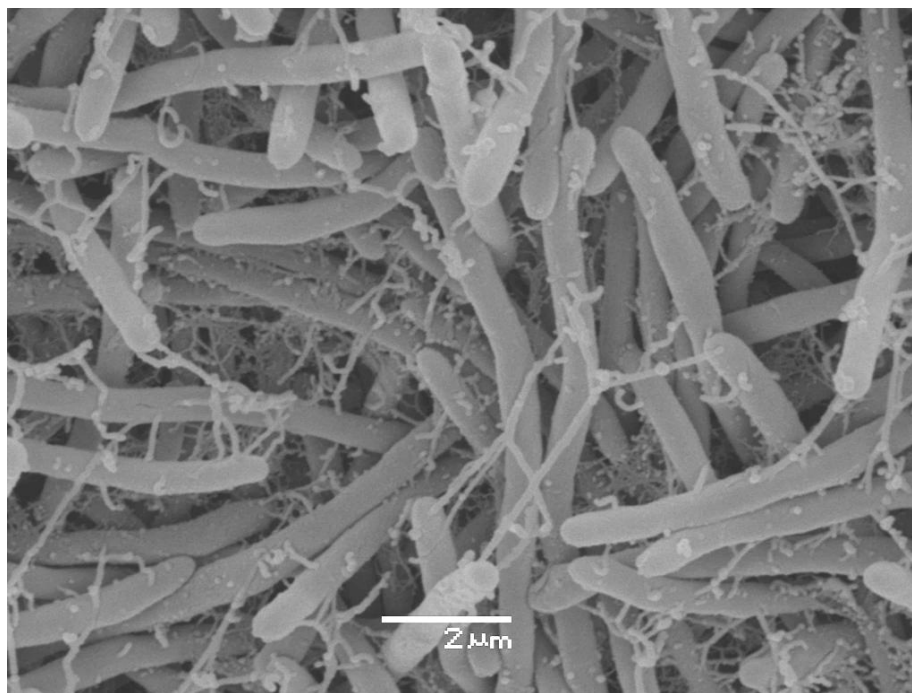
**Obr. 21:** Detail kolonie *Streptomyces durmitorensis* kultivované na pevné NE půdě.  
(SEM, zvětšení 9000x)



**Obr. 22:** Mladé mycelium *Streptomyces durmitorensis*.  
Snímek byl získán snímáním části pevné LB půdy s narostlými koloniemi streptomycet pod UV  
osvětlením (fluorescenční binolupa, objektiv 0,8x).

Mladé kolonie jsou polokulovité a nestrukturované, evidentně schopné produkovat fluorescenční sekundární metabolity (Obr. 22).

Z nestrukturovaných kolonií rostlých na pevné půdě byly připraveny vzorky pro elektronovou mikroskopii. Kolonie byla skalpelem opatrně vyříznuta i s částí gelu a připravena jako preparát pro SEM.



**Obr. 23:** Detailní snímek mladého mycelia *Streptomyces durmitorensis*. Streptomycety byly narostlé na pevné LB půdě. (SEM, zvětšení 9000x).

Vlákna mladého mycelia (Obr. 23) jsou na rozdíl od starších kultur (Obr. 21) hladká, nezprohýbaná a poměrně dlouhá.

Tvorba kulovitých mycelií (Obr. 17) byla pozorována pouze u třepané kultury kultivované v 30 °C. V netřepané kultuře nárůst kulovitých mycelií pozorován nebyl. U obou typů mycelií lze pozorovat jejich odlišný charakter. Mycelium z třepané kultury je více rozvolněné a hyfy vlnitější ve srovnání s kulturami kultivovanými na pevných agarových půdách.

## 5.2 Sekvenace DNA pro ověření druhu *Streptomyces durmitorensis*

Snímky z elektronového mikroskopu byly zaslány RNDr. Aleně Kubátové, CSc. (odbornici na mikroskopické houby) s žádostí o konzultaci ohledně určitých struktur nacházejících se na myceliu. Doktorka Kubátová v odpovědi naznačila, že podobné struktury se nachází u některých mikroskopických hub, například kvasinek *Aureobasidium pullulans*. Sekvenace části genu SSU byla tedy použita k ověření, že se skutečně jedná o čistou kulturu rodu *Streptomyces durmitorensis*.

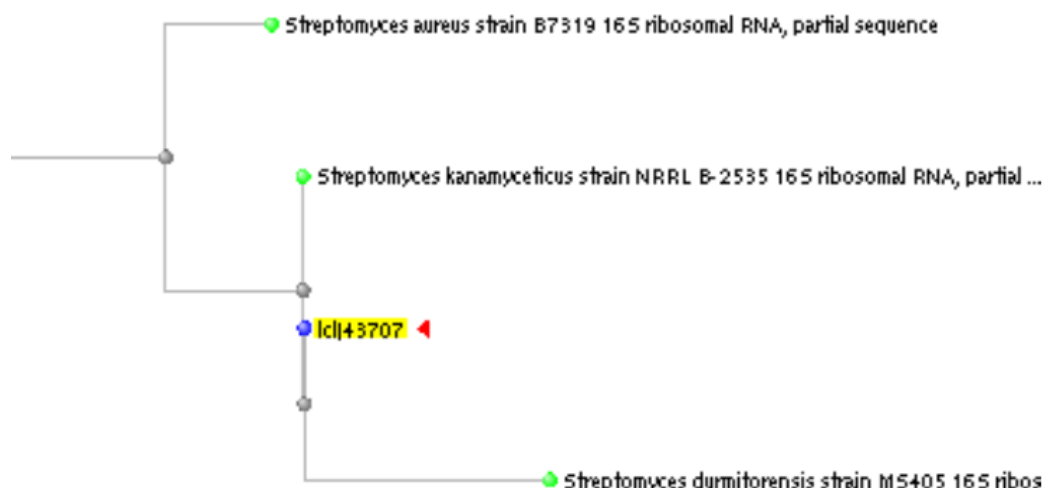
Vzorky pro sekvenaci byly připraveny prostým setřením jedné kolonie streptomycet narostlé na pevné agarové půdě a vložením do PCR mikrozkušavky obsahující příslušný pufr (oddíl 4.9). Po přidání vhodných primerů a proběhnutí PCR reakce byl vzorek nanesen na gel pro agarózovou elektroforézu. Po rozdělení amplifikovaných fragmentů, byl amplifikát bakteriální DNA s pomocí transluminátoru vyříznut z gelu, přečištěn a sekvenován.

Výsledky sekvenace části genu SSU (16S rDNA):

```
ATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGGCTTGTCACGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTA
ACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCAGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTG
GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGG
CCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGCGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGGTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGCCGCAGCTA
ACGCATTAAGTTCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCA
AGGCTTGACATATACCGGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCCTTGTGGTTCGGTATACAGGTG
GTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTTGTTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTGATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGG
TCAACTCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCAC
ACGTGCTACAATGGCAGGTACAATGAGCTGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTCAAAAA
GCCTGTCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAAT
CGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAAATACGTTCCCGGGGCACCGCTGTCAGATATTGGGCGTA
AGAGCTCGTAGGGCGGC
```

Výše uvedená sekvence byla zadána do aplikace NCBI Blast (program BLASTN 2.2.26+) s omezením pro vyhledávání v databázích pro sekvence genu 16S ribozomální

RNA (bakterie a archea) s požadavkem na vysoce homologní sekvence (megablast). Aplikace vyhledala tři zástupce rodu *Streptomyces*, které vykazují shodu vyšší než 99 %: *Streptomyces kanamyceticus* (NRRL B-2535), *Streptomyces aureus* (B7319) a *Streptomyces durmitorensis* (MS405) a zařadila druh s výše uvedenou sekvencí do blízkosti *Streptomyces kanamyceticus* a *Streptomyces durmitorensis* (Obr. 24).



**Obr. 24:** „Distance tree of results“ z výsledků NCBI Blast.

Tento fylogenetický strom byl získán zadáním sekvence získané sekvenováním částí genu pro SSU bakterie *Streptomyces durmitorensis* a požadavkem na zobrazení příbuznosti s dalšími sekvenčně příbuznými druhy.

Dle výsledků sekvenace tohoto genu se s velkou pravděpodobností jedná skutečně o askomycetu druhu *Streptomyces durmitorensis*. Pro odlišení výše uvedené trojice streptomycet není ve studované části genu pro 16S rRNA dostatečná variabilita. Pro účely ověření, že se nejedná o úplně jiný druh mikroorganismu (kontaminace, záměna kultivačních nádob, špatně určený druh) jsou tato data dostačující.

## 5.3 Fluorescenční charakteristiky makrolidu DDHR

Fluorescenční spektrum fluoroforů ovlivňuje řada vnějších faktorů. Některé fluorescenční sondy jsou citlivé na fyzikálně-chemické změny svého okolí (teplota, pH, polarita prostředí atd.). K dokonalému pochopení vlastností konkrétní sondy je třeba zjistit jejich chování v různém prostředí a za různých podmínek.

Fluorescenční charakteristiky makrolidu DDHR byly měřeny pomocí spektrofotometru Fluoromax-3 nebo pomocí konfokálního mikroskopu Leica SP2.

Zdrojem světla u spektrofotometrů je xenonová výbojka emitující konstantní proud fotonů. Pomocí excitačního monochromátoru je vybrána určitá excitační vlnová délka. Fluorescence je snímána zpravidla kolmo k dopadajícímu záření a detekována po průchodu emisním monochromátorem na fotonásobiči. Spektrum, které je měřeno při konstantní vlnové délce emise a různé vlnové délce excitace, se nazývá excitační spektrum. Naopak emisní spektra jsou měřena při konstantní excitační vlnové délce.

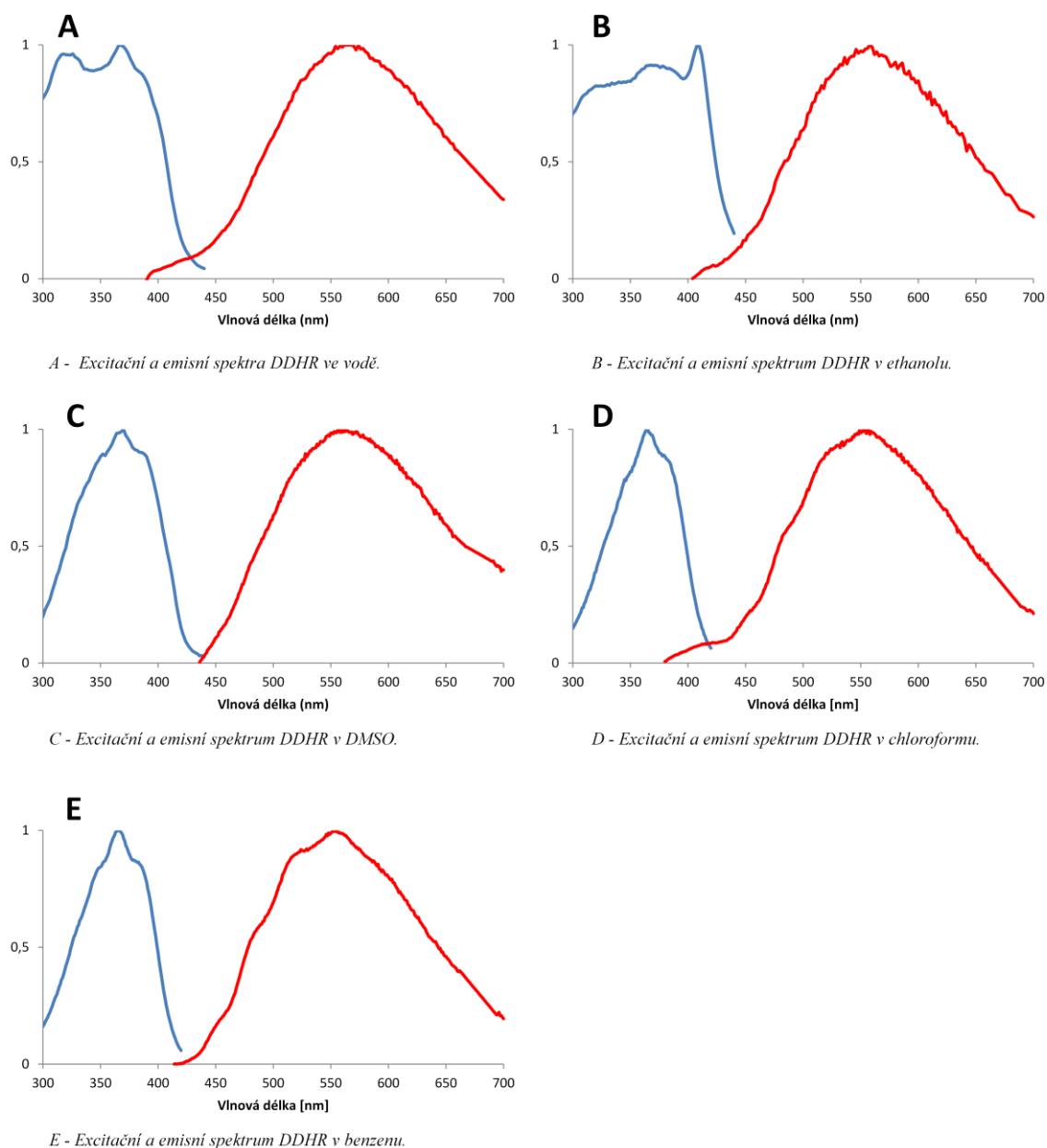
U dat naměřených na přístroji Fluoromax-3 bylo nutné provést jejich korekci z důvodu odlišné citlivosti detektoru a různé propustnosti monochromátoru pro různé vlnové délky. Emisní korekční koeficient pro přístroj Fluoromax-3 jsou uvedeny v grafu (Graf 1, oddíl 4.13). Rovněž absorpční spektra musela být korigována dle excitační korekční křivky (Graf 2, oddíl 4.13), z důvodu rozdílné intenzity lampy a různé propustnosti monochromátoru pro různé vlnové délky.

### 5.3.1 Fluorescence DDHR v různých rozpouštědlech

Na spektrofotometru Fluoromax-3 byla měřena emisní a excitační spektra DDHR v různých rozpouštědlech. Emisní spektra byla měřena při excitaci 340 nm, excitační spektra při emisi 580 nm. Tyto hodnoty vlnových délek byly při pilotních experimentech nalezeny jako optimální.

Data pro všechna rozpouštědla byla měřena v rozsahu vlnových délek 300–440 nm pro excitační spektra, 380–700 nm pro emisní spektra. Všechna spektra byla měřena v krocích po 1 nebo 2 nm. Vzorky byly připraveny přidáním 2  $\mu$ l zásobního roztoku DDHR v DMSO (koncentrace 10 mg/ml) do 2 ml rozpouštědla. Koncentrace DDHR

byla tedy při měření spektrálních vlastností 14 $\mu$ M. Kontrola nepřítomnosti efektu vnitřního filtru byla provedena vizuálním testem. U všech spekter byly změřeny i slepé vzorky (blanky), tedy spektra samotných rozpouštědel. Tato spektra byla od spekter naměřených pro DDHR odečtena. Všechna spektra byla normalizována na maximum. Excitační spektra jsou znázorněna modře, emisní červeně.



**Obr. 25: Excitační a emisní spektra DDHR v různých rozpouštědlech.**

Normalizovaná excitační a emisní spektra DDHR ve vodě (A), v ethanolu (B), v DMSO (C), v chloroformu (D) a v benzenu (E). Emisní spektra byla měřena při excitaci 340 nm, excitační spektra při emisi 540 nm.

Voda představuje reálné prostředí pro aplikaci DDHR na buňky. Samotný DDHR je ve vodě sice jen velmi málo rozpustný, ale po přidání ze zásobního roztoku v DMSO se rozpouští lépe. Podíl DMSO je zde však zanedbatelný. V koncentracích do 1% DMSO nijak neovlivňuje viabilitu a fyziologii studovaných buněčných populací. Na normalizovaném excitačním spektru DDHR (v DMSO) ve vodě je možné zaznamenat dvě excitační maxima (Obr. 25 A).

Ethanol představuje zástupce polárních rozpouštědel, ve kterém je DDHR dobře rozpustný a které je zároveň často využívaným a dostupným rozpouštědlem pro mnoho chemických látek. Pro tato měření byl vybrán zásobní roztok DDHR v DMSO rozpuštěný v ethanolu. Nejedná se tedy o extrakt DDHR rozpuštěný přímo v ethanolu. Podíl DMSO je zde však zanedbatelný (0,001 %). Excitační a emisní spektrum je uvedeno v souhrnném obrázku (Obr. 25 B).

Extrakt DDHR je pro zásobní roztok standardně rozpouštěn v DMSO. V DMSO bylo velmi obtížné naměřit reálná excitační a emisní spektra DDHR, protože použité DMSO (99,9% v čistotě pro molekulární biologii) má samo o sobě vlastní fluorescenci. Přídavek DDHR část fotonů z fluorescence DMSO absorbuje, tudíž odečtení fluorescenčního spektra DMSO od naměřených spekter je problematické. Výsledná spektra tedy nemusí tvarem plně odpovídat reálnému fluorescenčnímu spektru DDHR v DMSO. Naměřená spektra jsou uvedena v souhrnném obrázku (Obr. 25 C).

Chloroform je nepolární rozpouštědlo vhodné pro rozpouštění lipidů. DDHR byl přidán ze zásobního roztoku v DMSO, podíl DMSO je stejně jako v předchozích případech zanedbatelný. Excitační a emisní spektra DDHR v chloroformu jsou uvedena v souhrnném obrázku (Obr. 25 D).

Benzen je dalším zástupcem nepolárních rozpouštědel. Podobně jako u předcházejících spekter i zde byl DDHR přidán do benzenu ze zásobního roztoku v DMSO. Naměřená excitační a emisní spektra fluoroforu v tomto rozpouštědle jsou uvedena v souhrnném obrázku (Obr. 25 E).

V nepolárních rozpouštědlech dekanu a hexanu nebylo možné kvantitativně rozpustit DDHR ze zásobního roztoku v DMSO ani DDHR přímo ze suchého extraktu. Spektra naměřená na těchto vzorcích by nevypovídala o skutečných spektrálních vlastnostech fluoroforu, proto zde nejsou uvedena.

Z výše uvedených grafů (Obr. 25) je patrné, že tvar emisního spektra DDHR zůstává v různých rozpouštědlech velmi podobný. Nebude zde tedy pravděpodobně hrát roli



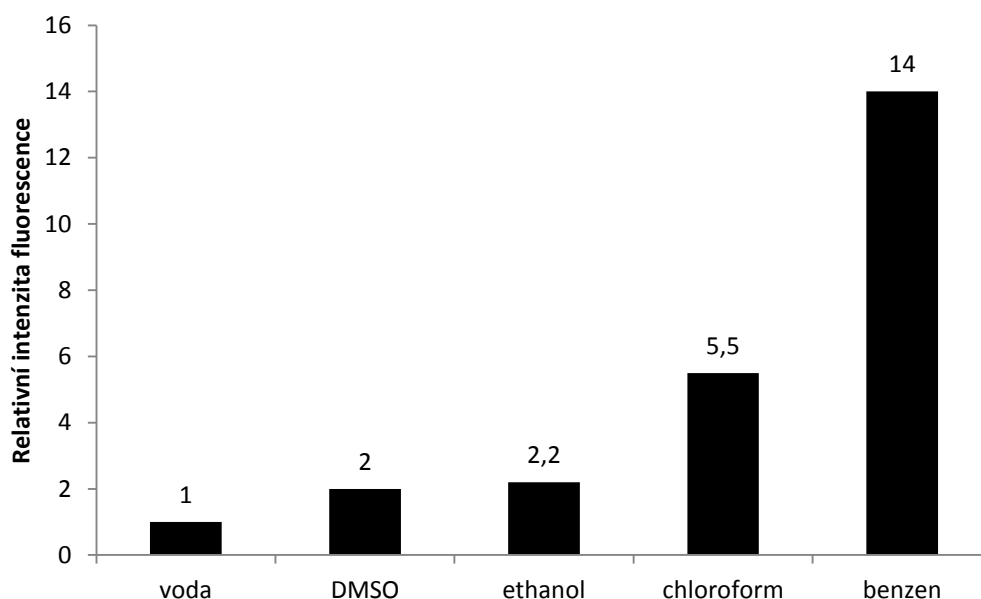
relaxace rozpouštědla. Emisní spektrum je velmi široké, pokrývá oblasti od modré do červené. Vizualně se fluorescence jeví jako zeleno-žlutá. V polárních rozpouštědlech jsou emisní spektra DDHR „hladká“, zatímco v nepolárních rozpouštědlech je patrná rezonanční struktura podobně jako v excitačních spektrech. Velké rozdíly jsou hlavně u excitačních spekter.

Pomocí programu Fityk byla pro výše uvedená rozpouštědla zjištěna excitační a emisní maxima proložení Gaussovy křivky horní částí korigovaného emisního nebo excitačního spektra. Emisní maxima a intenzita fluorescence DDHR pro jednotlivá rozpouštědla jsou uvedena v tabulce (Tab 1). Pro kvantitativní posouzení polarity rozpouštědla je vhodnou charakteristikou dielektrická konstanta. Čím je dielektrická konstanta vyšší, tím je rozpouštědlo polárnější. Poměry intenzit fluorescence vůči vodě jsou pro větší názornost vyneseny do sloupcového grafu (Graf 3).

<b>Rozpouštědlo</b>	<b>Excitační maximum</b>	<b>Emisní maximum</b>	<b>Intenzita fluorescence vůči vodě</b>	<b>Dielektrická konstanta rozpouštědla (20 °C)</b>
Voda	326 nm a 366 nm	566 nm	1	81,6
DMSO	370 nm	556 nm	2	46,7
Ethanol	408 nm	558 nm	2,2	24
Chloroform	365 nm	555 nm	5,5	4,8
Benzen	366 nm	555 nm	14	2,3
Dekan	-	-	-	2
Hexan	-	-	-	2

**Tab. 1: Tabulka naměřených hodnot fluorescenčních charakteristik DDHR v jednotlivých rozpouštědlech s uvedením dielektrické konstanty pro každé rozpouštědlo.**

Porovnání excitačního a emisního maxima DDHR ve vodě, DMSO, ethanolu, chloroformu a benzenu a porovnání intenzity fluorescence DDHR s intenzitou jeho fluorescence ve vodě. U všech rozpouštědel včetně dekanu a hexanu jsou uvedeny jejich dielektrické konstanty.



**Graf 3: Intenzita fluorescence DDHR v jednotlivých rozpouštědlech vztažená vůči intenzitě fluorescence DDHR ve vodě.**

Sloupcový graf znázorňuje velikosti intenzity fluorescence DDHR v DMSO, ethanolu, chloroformu a benzenu vztažené vůči intenzitě fluorescence DDHR ve vodě.

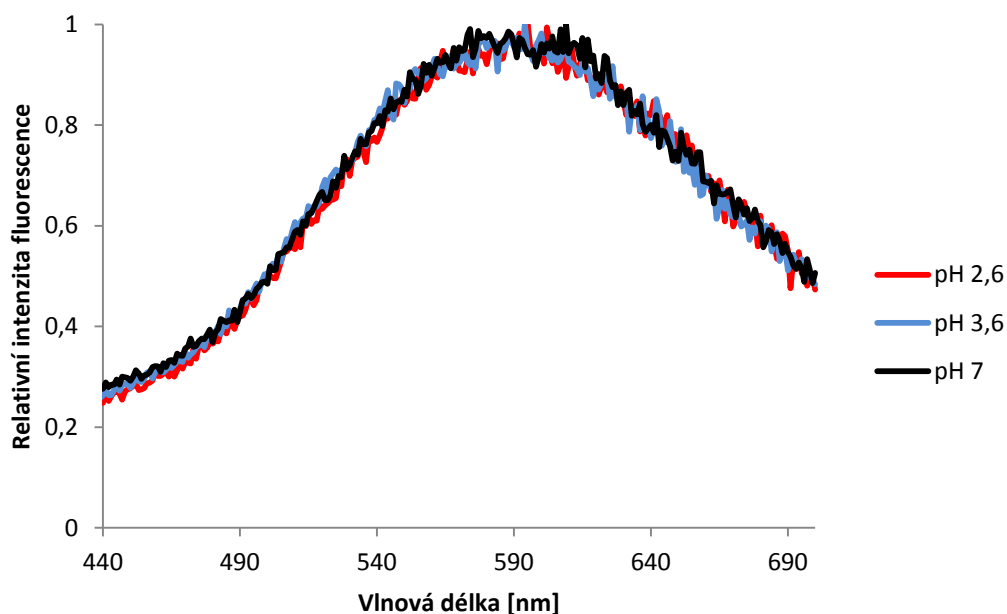
Z tabulky (Tab. 1) je možno vyčíst, že emisní maxima DDHR v jednotlivých rozpouštědlech zůstávají téměř stejná. Pouze u vody je zde výrazný posun o 10 nm směrem k červené oblasti. Naopak excitační maxima se velmi výrazně mění. Jak je vidět, pro všechna rozpouštědla kromě ethanolu jsou excitační maxima DDHR okolo 366 nm. Pouze u vody jsou maxima dvě, u ethanolu je maximum posunuto k delším vlnovým délkám kolem 408 nm.

Intenzita fluorescence DDHR ve vodě je v porovnání s méně polárními rozpouštědly velmi nízká (Graf 3). Intenzita fluorescence v ethanolu byla 2,2krát vyšší, v případě chloroformu 5,5krát vyšší a u benzenu 14krát vyšší než ve vodě. Se snižující se polaritou prostředí roste intenzita fluorescence, avšak ve velmi nepolárních rozpouštědlech jako je dekan a hexan se DDHR již téměř vůbec nerozpouští, proto intenzitu fluorescence nebylo možné korektně měřit. Intenzita fluorescence v jednotlivých rozpouštědlech však může záviset na mnoha faktorech, včetně nevhodně zvolené vlnové délky excitace pro konkrétní rozpouštědlo nebo změna extinkčního koeficientu z důvodu změny tvaru molekuly v jednotlivých rozpouštědlech. Tyto faktory, které by mohly intenzitu ovlivňovat, zatím nebyly proměřeny.

Z výše uvedených dat lze možné soudit, že dvojvrstvená buněčná membrána s dielektrickou konstantou 2–10 by tedy měla představovat optimální prostředí pro fluorescenci DDHR.

### 5.3.2 Vliv pH na fluorescenční spektra DDHR

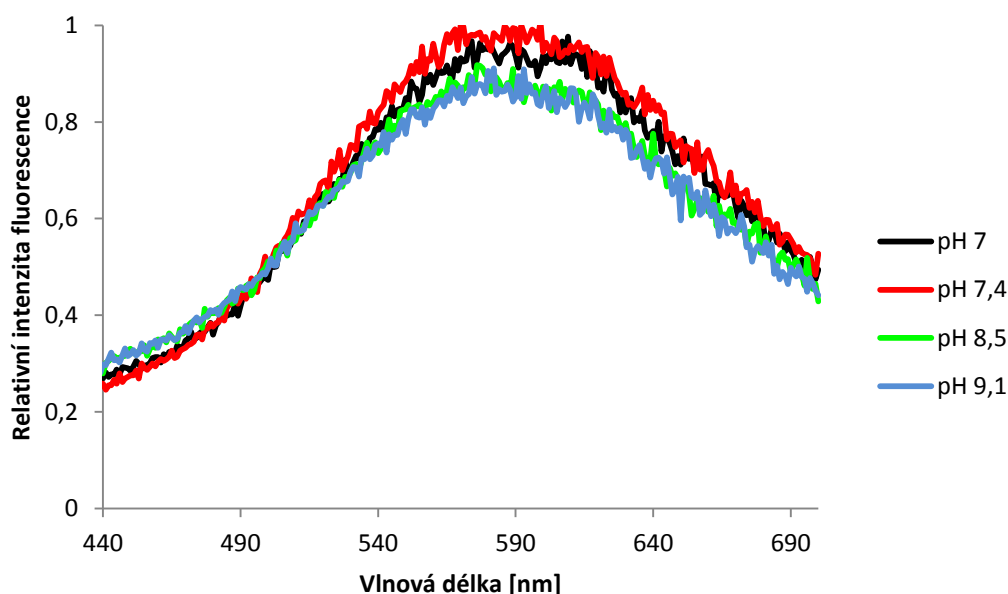
Změna pH může mít vliv na průběh fluorescenčních spekter, proto byly pomocí spektrofluorometru měřeny emisní fluorescenční křivky DDHR v pufru TBS o různém pH (přídavkem NaOH nebo HCl k roztoku s DDHR) pro ověření, zda pH má vliv na intenzitu fluorescence nebo změnu fluorescenčního maxima.



**Graf 4: Fluorescenční spektra DDHR měřená v pufru TBS kyselého pH.**

Emisní spektra byla měřena v pH 2,6, pH 3,6 a pH 7 při excitaci v 370 nm za použití filtru 405LP.

Kyselé prostředí nemá na tvar emisního spektra ani na intenzitu fluorescence žádný vliv (Graf 4). Tvar spekter je téměř identický, maximum se neposunulo.



**Graf 5: Fluorescenční spektra DDHR měřená v pufru TBS zásaditého pH.**

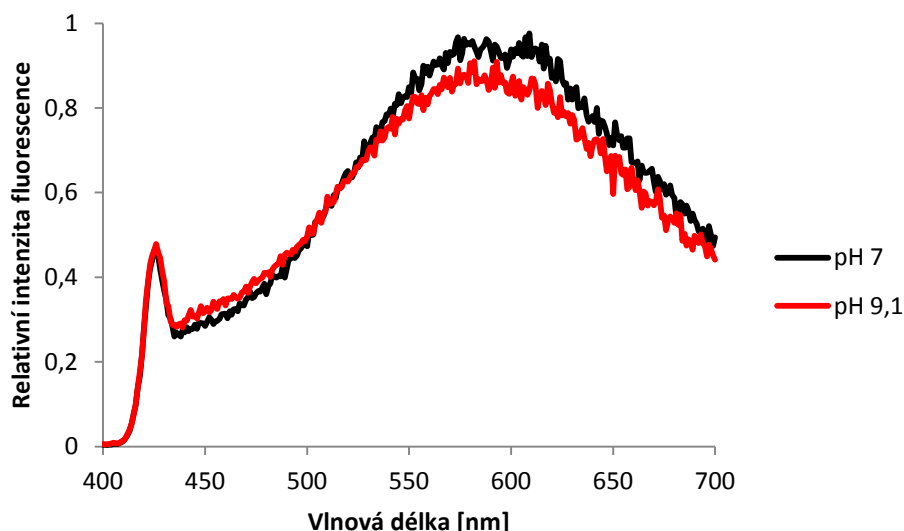
Emisní spektra byla měřena pro pH 7, pH 7,4, pH 8,5 a pH 9,1 při excitaci v 370 nm za použití filtru 405LP.

V zásaditém prostředí lze změny tvaru emisního spektra DDHR zaznamenat (Graf 5).

Vlnová délka maxima se nemění, mění se však tvar spekter

Při porovnání tvaru emisních spekter pro neutrální a zásadité pH je zřejmé, že intenzita fluorescence DDHR v zásaditém prostředí v krátkovlnných oblastech narůstá na úkor hodnoty emisního maxima. Všechna spektra se protínají v izosbestickém bodě s vlnovou délkou asi 500 nm. Nabízí se dvě vysvětlení tohoto jevu. Buď má zásadité pH vliv na zvýšení intenzity fluorescence v oblastech s kratší vlnovou délkou a zvyšuje se podíl formy DDHR, která emituje více modrých fotonů, nebo se v takovém prostředí tvoří stabilní agregáty DDHR a světlo lampy se v důsledku chyby monochromátoru od těchto agregátů rozptyluje, dopadá na detektor a v rámci snímaného rozsahu vlnových délek se jeví jako zvýšení intenzity fluorescence v modré oblasti. V takové případě by však bylo vhodné použít excitační filtr, který absorbuje nežádoucí vlnové délky světla lampy a nepropustí je do kyvety.

Pro větší názornost jsou v Grafu 6 vynesena proti sobě pouze spektra pro pH 7 a pH 9,1 včetně Ramanova rozptylu.



**Graf 6: Emisní spektra DDHR naměřená v TBS při pH 7 a pH 9,1.**

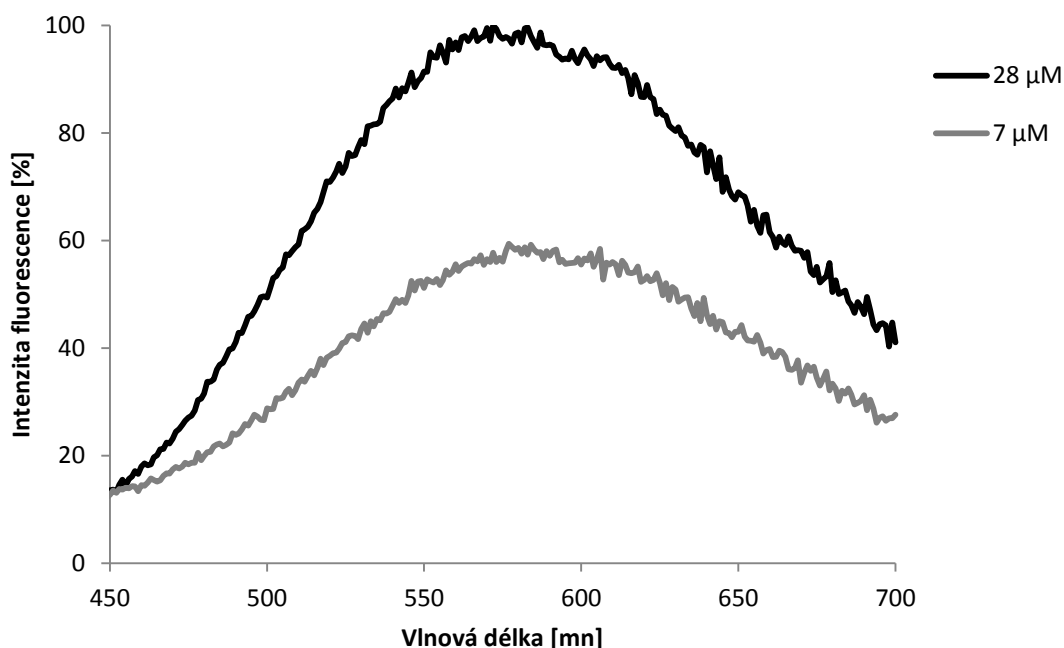
Spektra jsou vynesena včetně Ramanova rozptylu pro zřetelnější znázornění nárůstu intenzity fluorescence v krátkovlnné oblasti. Excitace 370 nm, filtr 405LP.

Z rozdílu emisních spekter DDHR (Graf 6) je vidět jasný nárůst fluorescence v krátkovlnné oblasti okolo 455 nm, naopak intenzita fluorescence v maximu se snižuje. Z výše uvedených Grafů (4 a 5) je patrné, že změna pH prostředí nemá výrazný vliv na posun fluorescenčního maxima DDHR ke kratším nebo delším vlnovým délkám. Má však vliv na tvar spektra, tedy na intenzitu fluorescence v jednotlivých vlnových délkách.

### 5.3.3 Závislost fluorescence DDHR na jeho koncentraci

Během měření fluorescenčních charakteristik DDHR bylo pozorováno, že ve vodném prostředí intenzita fluorescence neroste lineárně společně s jeho zvyšující se koncentrací.

Za stejného nastavení přístroje byla naměřena emisní spektra DDHR při dvou různých koncentracích -  $7\mu\text{M}$  a  $28\mu\text{M}$ . Naměřená intenzita fluorescence je uvedena v procentech vzhledem k nejvyšší naměřené fluorescenční intenzitě.



**Graf 7:** Vynesení závislosti intenzity fluorescence DDHR na jeho koncentraci v pufru TBS. Emisní spektra byla měřena pro 7µM a 28µM DDHR v TBS. Excitace 370 nm, filtr 405LP.

Vybraná vlnová délka [nm]	450	500	550	600	650
Relativní intenzita fluorescence pro 7µM DDHR	0,127	0,288	0,512	0,555	0,430
Relativní intenzita fluorescence pro 28µM DDHR	0,136	0,494	0,914	0,943	0,689
Poměr intenzit fluorescence (28µM DDHR / 7µM DDHR)	1,07	1,72	1,79	1,70	1,60

**Tab. 2:** Nameřené hodnoty intenzity fluorescence DDHR v TBS a jejich poměr pro vybrané vlnové délky.

Se zvyšující se koncentrací DDHR se zvyšuje i intenzita fluorescence, avšak ne lineárně (Graf 7). 4krát vyšší koncentrace DDHR by měla ve výsledku přinést přibližně 4krát vyšší fluorescenční intenzitu. Tento předpoklad však v tomto případě neplatí, protože intenzita fluorescence se zvyšuje maximálně 1,87krát. Efekt vnitřního filtru se při těchto koncentracích neprojevil, což bylo zjištěno vizuální kontrolou ve spektrofleurometru. U koncentrací DDHR nad 50 µM se již tzv. „vnitřní filtr“, tedy jev, kdy látka ve vysoké koncentraci absorbuje část excitačního záření, které vstupuje do kyvety, projevuje.

Zároveň je z Grafu 7 jasné, že fluorescenční spektrum DDHR ve vyšší koncentraci má maximum blíže krátkovlnným oblastem.

Je tedy možné usuzovat, že DDHR nejspíše tvoří ve vodném prostředí micely/agregáty, které se se zvyšující se koncentrací DDHR v roztoku tvoří více ochotně. Intenzita fluorescence agregátů je nižší než intenzita fluorescence monomerů.

### 5.3.4 Fluorescence DDHR v liposomech

Liposomy představují jeden z typů umělých membrán, na kterém je možné studovat vlastnosti molekul asociovaných s membránami. Výhodou je možnost vytvoření liposomů o jasně definovaném složení i struktuře. Ke studiu fluorescenčních vlastností DDHR byly použity multilamelární liposomy s obsahem sterolů nebo bez nich.

Z literatury je známo, že některé makrolidy podobné DDHR interagují se steroly. Také z našich výsledků je patrné, že makrolid DDHR je schopný vazby do membrán, které značí díky své snadno detekovatelné fluorescenci. Fluorescence na liposomech s různým složením včetně cholesterolu a ergosterolu byla měřena za účelem zjištění možné interakce DDHR/sterol.

Ke studiu interakce sterolů a DDHR byly zvoleny liposomy o lipidovém složení dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC), dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC) a cholesterol, nebo ergosterol. Všechny tyto látky byly rozpuštěny v chloroformu na koncentraci 10 mg/ml, poté smíchány v poměrech dle Tabulky 3, odpařeny a vytřepány v pufru TBS. Výsledná koncentrace lipidů byla 1 mg/ml.

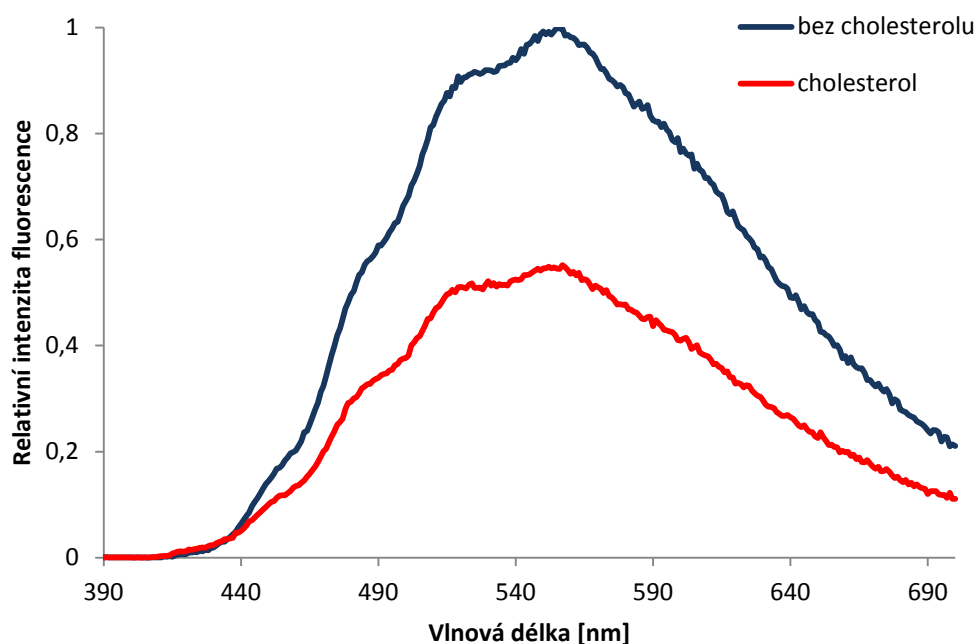
	<b>0 % sterol</b>	<b>10 % (w/v) cholesterol</b>	<b>10 % (w/v) ergosterol</b>
<b>DPPC+DMPC</b>	DMPC : DPPC 1:1	DPPC : DMPC : chol 9 : 9 : 2	DPPC : DMPC : ergo 9 : 9 : 2

**Tab. 3: Složení liposomů pro studium fluorescenčních charakteristik DDHR.**

Liposomy, pro něž jsou data uvedena, byly namíchány z DPPC a DMPC v poměru 1:1. K části takto smíchaných lipidů byl přidán 10 % (w/v) cholesterol, nebo ergosterol.

Namícháním lipidů v uvedených poměrech (Tab. 3) vznikly liposomy s obsahem cholesterolu, nebo ergosterolu. Pro měření fluorescence bylo DDHR smícháno s 200  $\mu$ l liposomů na výslednou koncentraci 35  $\mu$ M DDHR. Tato koncentrace byla určena jako optimální pro co nejpřesnější výstup dat z měření na spektrofluorometru, tedy aby počet fotonů dopadajících na detektor nepřesahoval  $10^6$  fotonů.

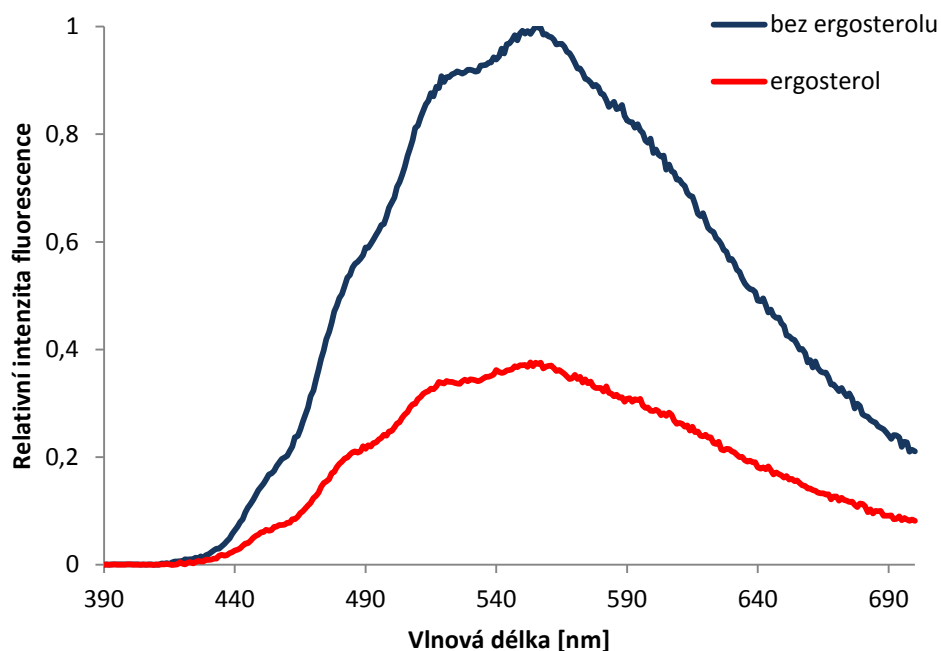
Výsledky fluorescenčního měření jsou uvedeny v Grafech 8 a 9. Zde jsou uvedena pouze data pro liposomy o lipidovém složení DMPC/DPPC (případně s cholesterolem, nebo ergosterolem). Takové lipidové složení se nejvíce blíží složení reálné membrány. V liposomech složených pouze z jednoho typu fosfolipidu (DMPC nebo DPPC) nebyl ve srovnání se směsí lipidů DMPC/DPPC žádný rozdíl.



**Graf 8: Emisní fluorescenční spektra DDHR naměřená na liposomech o složení DPPC/DMPC s cholesterolem nebo bez cholesterolu.**

Emisní spektrum 35  $\mu$ M DDHR na liposomech bez cholesterolu je znázorněno modře, červeně na liposomech s 10% obsahem cholesterolu. Spektra byla měřena při excitaci 370 nm.

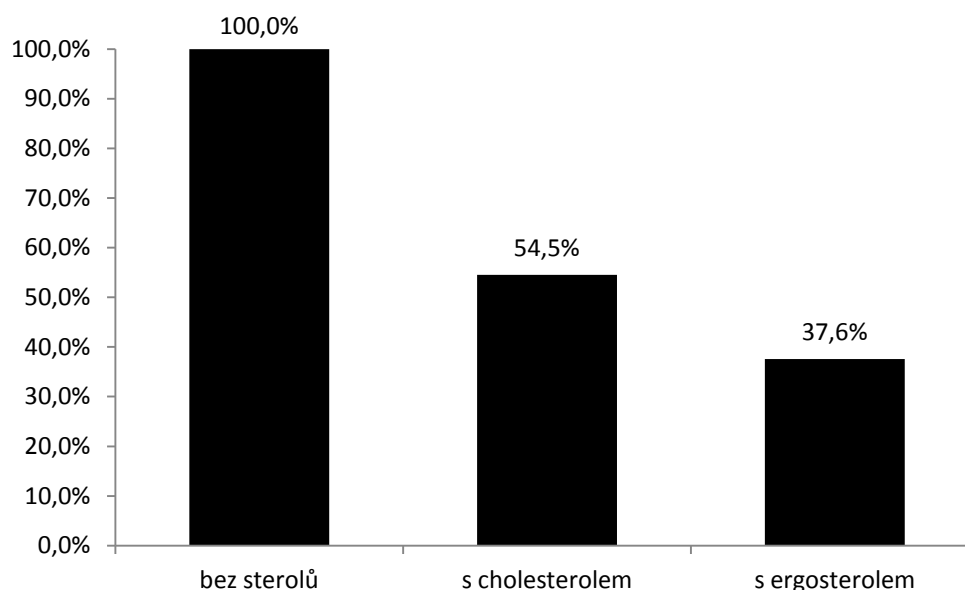




**Graf 9: Emisní fluorescenční spektra DDHR naměřená na liposomech o složení DPPC/DMPC s ergosterolem nebo bez ergosterolu.**

Emisní spektrum 35 $\mu$ M DDHR na liposomech bez ergosterolu je znázorněno modře, červeně na liposomech s 10% obsahem ergosterolu. Spektra byla měřena při excitaci 370 nm.

Z obou grafů (Graf 8, Graf 9) je zřejmé, že v liposomech se steroly dochází k zeslabení intenzity fluorescence DDHR. Tvar spektra i emisní maximum (555 nm) přitom zůstávají stejné, snižuje se pouze intenzita fluorescence. Poměr intenzit fluorescence DDHR v jednotlivých typech liposomů je pro názornost uveden v následujícím grafu (Graf 10). Hodnoty jsou vyneseny pro 555 nm, tedy pro maxima intenzity spekter.



**Graf 10: Intenzita fluorescence DDHR v přítomnosti sterolů**

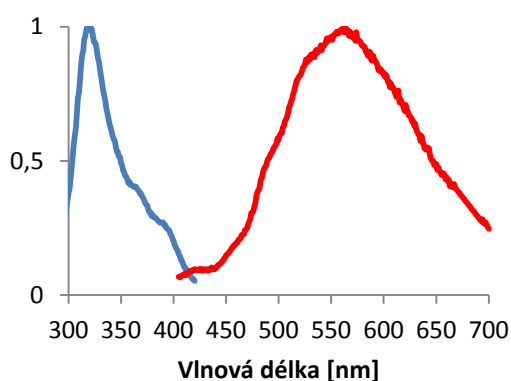
Sloupcový graf znázorňuje poměr intenzit fluorescence DDHR v multilamelárních liposomech bez sterolů (vyneseno jako 100% intenzita), s cholesterolem, nebo s ergosterolem.

Ergosterol zeslabuje intenzitu fluorescence DDHR ve větší míře než cholesterol. (Graf 10). U liposomů s obsahem cholesterolu měl DDHR asi o polovinu nižší intenzitu fluorescence než u liposomů bez sterolů. U liposomů s ergosterolem se intenzita fluorescence DDHR snížila asi na třetinu intenzity naměřené na liposomech bez sterolů. Zdá se tedy, že přítomnost sterolů zhasí intenzitu fluorescence DDHR. Je ale rovněž možné, že se DDHR do liposomů s obsahem sterolů váže méně ochotně, část fluoroforu zůstává ve vodném prostředí, kde dle výsledků z oddílu 5.3.1 vykazuje menší intenzitu fluorescence.

### 5.3.5 Fluorescence DDHR na buňkách Jurkat

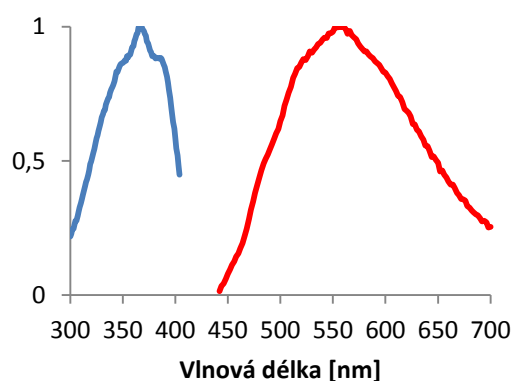
Živé buňky představují pro fluorofor jiné prostředí než rozpouštědla nebo liposomy. Fakticky představují reálné systémy živé přírody. V buněčných membránách je komplexní lipidové složení, kterého lze v umělých membránách docílit jen velmi obtížně. Navíc, na rozdíl od umělých membrán, je zde mnoho dalších interakčních partnerů, které mohou fluorescenci DDHR ovlivňovat. Suspenzní buňky linie Jurkat byly vybrány jako modelové buňky ke studiu fluorescence DDHR v membránách živých systémů díky snadné manipulaci s nimi během měření.

Fluorescenční spektrum DDHR na buněčných membránách bylo měřeno po inkubaci buněk Jurkat s 5  $\mu$ M DDHR. Byly sledovány změny excitačních i emisních spekter měřené jednak pro DDHR v čistém HBSS, jednak pro DDHR v HBSS s buňkami. Zde jsou uvedena excitační a emisní spektra DDHR měřená při emisní vlnové délce 540 nm a excitační vlnové délce 340 nm.



**Graf 11: Excitační a emisní spektrum DDHR v médiu HBSS.**

Modře je vyznačeno excitační spektrum měřené při emisi 540 nm, červeně emisní spektrum měřené při excitaci 340 nm. Spektra byla normalizována na maximum.



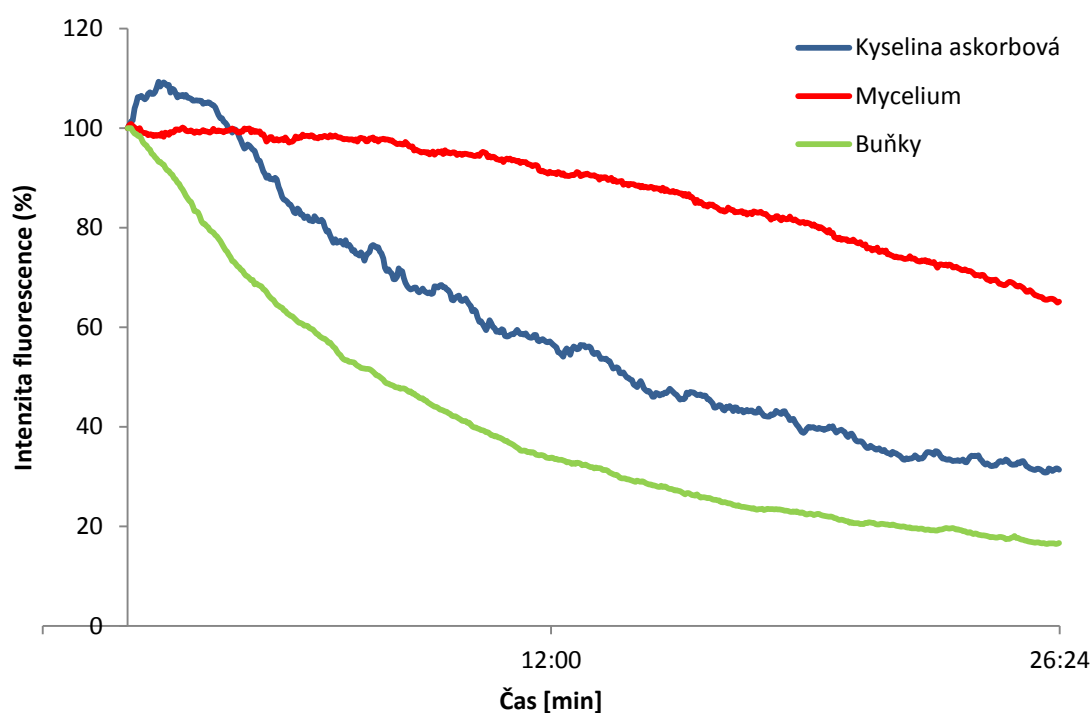
**Graf 12: Excitační a emisní spektrum DDHR v médiu HBSS s buňkami Jurkat.**

Modře je vyznačeno excitační spektrum měřené při emisi 540 nm, červeně emisní spektrum měřené při excitaci 340 nm. Spektra byla normalizována na maximum.

Emisní maximum DDHR naměřené na suspenzních buňkách Jurkat je dle zpracování v softwaru Fityk proložením Gaussovy křivky přes spektrum v 564 nm (Graf 12). Pro vzorky obsahující pouze DDHR v médiu (Graf 11) bylo stejným způsobem zjištěno maximum v 563 nm. Emisní spektra DDHR na buňkách i v HBSS se tvarem příliš neliší. Velké rozdíly je však možné pozorovat u excitačních spekter. Maximum excitace DDHR v HBSS je v 313 nm oproti 367 nm pro maximum excitace DDHR na buňkách. Tento velký rozdíl v excitačních spektrech je způsoben nejspíše tvorbou agregátů DDHR ve vodném prostředí s ionty. V přítomnosti membrán se DDHR váže do těchto struktur a tvoří agregáty. Proto je spektrum velmi podobné excitačním spektrům naměřeným v chloroformu nebo benzenu. Navíc intenzita fluorescence DDHR na buňkách byla asi 4krát vyšší než intenzita fluorescence DDHR v HBSS. Podle dříve získaných výsledků z měření fluorescence DDHR v prostředích s různou dielektrickou konstantou (oddíl 5.3.1) lze podobné chování DDHR v membránách (dielektrická konstanta v rozmezí 2–10) předpokládat.

### 5.3.6 Stabilita fluorescence

U fluorescence DDHR bylo pozorováno poměrně rychlé vysvěcování. Míra vysvěcování fluoroforů je jednou z velmi důležitých charakteristik například v optické mikroskopii, která často určuje praktickou využitelnost jednotlivých sond. Buňky značené DDHR jsou mimo jiné pozorovány pomocí optické mikroskopie, proto byla stabilita fluorescence měřena pomocí konfokálního mikroskopu Leica SP2. Vysvěcování bylo studováno na třech vzorcích – fixované HeLa buňky zalité do Mowiolu, fixované HeLa buňky zalité do Mowiolu s 10mM kyselinou askorbovou (antioxidační činidlo) a nefixované mycelium *Streptomyces durmitorensis* zalité do Mowiolu. Preparáty byly skenovány každé 2 sekundy laserem s vlnovou délkou 405 nm. Pro všechny tři vzorky bylo ponecháno stejné nastavení mikroskopu a intenzity laseru.



**Graf 13: Kinetika vysvěcování fluorescence DDHR za různých podmínek.**

Kinetika vysvěcování byla měřena pro vzorky: HeLa buňky značené DDHR a zalité do Mowiolu, HeLa buňky značené DDHR a zalité do Mowiolu s 10 mM kyselinou askorbovou a mycelium *Streptomyces durmitorensis* zalité do Mowiolu. Vzorky byly skenovány pomocí konfokálního mikroskopu a ze získaných snímků byla analyzována intenzita fluorescence programem ImageJ. Data nejsou korigována na fluktuace transmise laseru.

Buňky značené DDHR a zalité v Mowiolu bez aditiv vykazují největší míru vysvěcování fluorescence DDHR (Graf 13). Za 26 minut poklesla intenzita fluorescence po skenování konfokálním mikroskopem o 83 %. Naproti tomu u buněk zalitých v Mowiolu s kyselinou askorbovou se nejdříve intenzita fluorescence zvyšuje, následně klesá v podobné míře jako u preparátu bez kyseliny askorbové. Mezi kinetikou vysvěcování fluorescence DDHR na buňkách v Mowiolu s kyselinou askorbovou a bez ní není prakticky žádný rozdíl. Vyšší intenzita u buněk v Mowiolu s kyselinou askorbovou je dána počátečním zvýšením fluorescence, rychlost vysvěcování je však po této události u obou vzorků velmi podobná.

Mowiol má zásadité pH 8,5, což může ovlivňovat rychlost vysvěcování. Kyselina askorbová montovací médium okyselila na nedefinované nižší pH. U mycelia je vidět, že průběh vysvěcování není totožný s předchozími dvěma vzorky, ale intenzita fluorescence DDHR je stabilnější. Intenzita fluorescence v tomto případě klesla za 26 minut pouze o 35 %. V myceliu je jiné vnitřní prostředí než u eukaryotických buněk, optimální pro produkci makrolidu, proto zřejmě dochází k vysvěcování pomaleji než u extrahovaného DDHR v savcích buněčných membránách.

Svou roli v rozdílném vysvěcování fluorescence DDHR v savcích a bakteriálních buňkách by mohla hrát nepřítomnost sterolů v bakteriálních membránách případně látky stabilizující vznikající makrolid.

## 5.4 Bioaktivita

Bioaktivita je schopnost látky ovlivňovat živé buněčné systémy. Bioaktivní látky často inhibují proliferaci eukaryotických nebo prokaryotických buněk, ovlivňují jejich vnitřní metabolismus, strukturu nebo indukují programovanou buněčnou smrt. Z literatury je známo, že mnoho makrolidů je bioaktivních. Ke studiu bioaktivity DDHR bylo využito několik buněčných typů - bakteriální buňky, kvasinky a savčí buňky.

### 5.4.1 Toxicita pro bakteriální a kvasinkové buňky

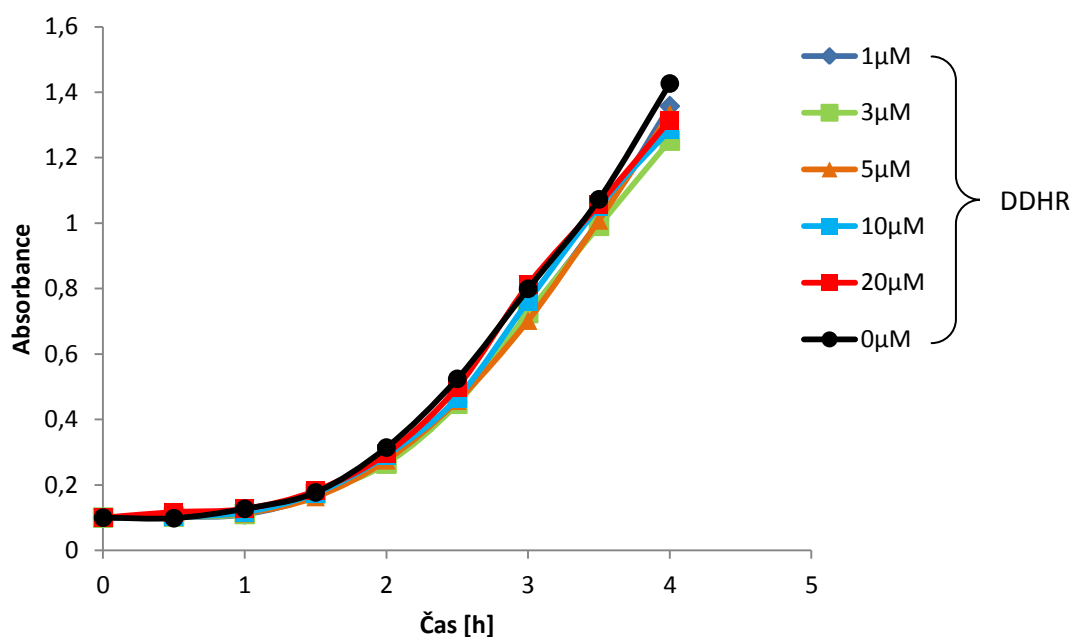
Mnoho polyenových makrolidů patří mezi účinná antibiotika nebo antifungicidy. Některé z nich jsou díky tomu využívány v medicíně. Ke studiu antibiotických účinků DDHR byly vybrány dva druhy organismů – *Saccharomyces cerevisiae* kmene EGY48 a *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$ . Účinky DDHR byly porovnány s makrolidem filipinem, který je známý svou silnou antifungicidní aktivitou.

Kinetika mikrobiálního růstu je definována jako nárůst buněčné hmotnosti v závislosti na čase. Velikost i hmotnost buněk se za vhodných podmínek zvětšují, u většiny mikroorganismů poté následuje nepohlavní množení, tedy buněčné dělení. Růst a množení mikrobiálních kultur lze měřit jako růst optické hustoty kultur měřený prostřednictvím absorbance při  $\lambda = 600$  nm. Kinetika růstu může být zpomalena nebo úplně zastavena některými toxiny, na které jsou mikroorganismy citlivé. Hodnoty absorbance ( $A_{600}$ ) pro jednotlivé kultury kultivované v tekutém médiu s různou koncentrací DDHR nebo filipinu (1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M a 20 $\mu$ M) byly měřeny během kultivace za optimálních podmínek pro jejich růst.

#### 5.4.1.1 Vliv makrolidů na bakterii *Escherichia coli* (kmen DH5 $\alpha$ )

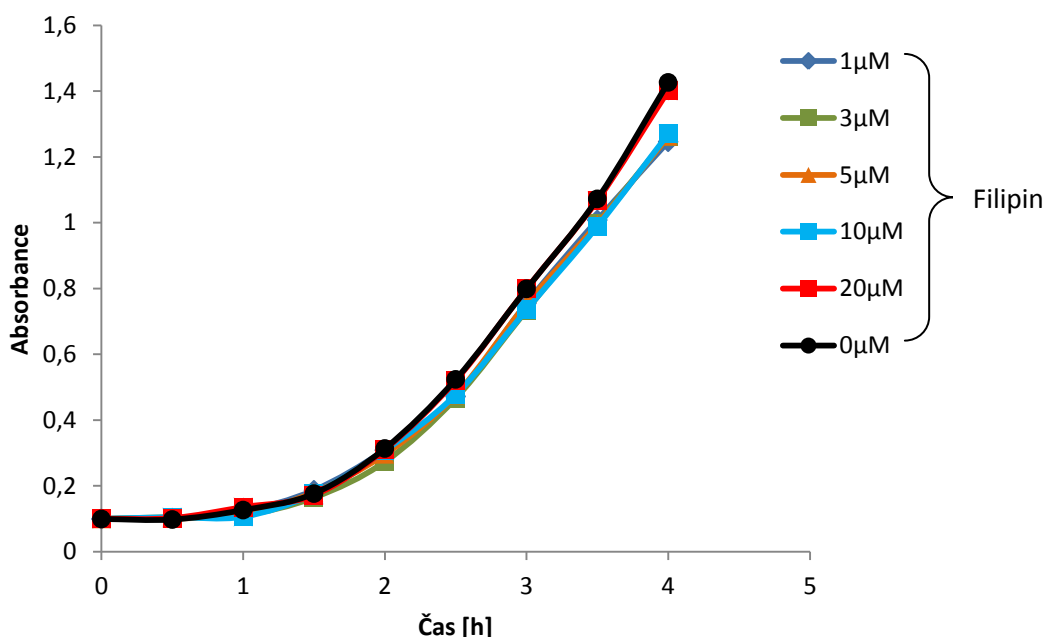
Růst bakterií *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$  byl sledován jako závislost optické hustoty kultury na čase. Měření probíhalo po dobu čtyř hodin, přičemž absorbance měřené při 600 nm ( $A_{600}$ ) byly na spektrofotometru zaznamenávány každých 30 min. Celkem bylo tedy provedeno osm měření. Z naměřených hodnot byly sestaveny růstové křivky.

Bakterie byly na počátku měření zaočkovány do tekutého média na hodnotu absorbance 0,1. Kultivace probíhala při 37 °C, pH 7 a třepání 200 rpm. Od šestého měření bylo nutné vzorky ředit, protože hodnoty absorbance překročily hodnotu 0,7 (měření při vysokých hodnotách absorbance je velmi málo citlivé a tím i nepřesné). V Grafu 14 je uvedena kinetika nárůstu bakteriální biomasy v LB médiu s koncentracemi DDHR 0 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M a 20 $\mu$ M. V Graf 15 je uvedena kinetika nárůstu bakteriální biomasy v LB médiu s koncentracemi filipinu ve stejném rozsahu jako u DDHR.



**Graf 14: Růstová křivka bakterií *Escherichia coli* kmene DH5a v médiu s DDHR.**

Růstová křivka byla měřena pro bakterie kultivované v tekutém LB médiu s 0 $\mu$ M, 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M a 20 $\mu$ M DDHR při teplotě 37 °C a intenzitě třepání 200 rpm. Absorbance byly zaznamenávány každých 30 minut po dobu 4 h.



**Graf 15: Růstová křivka bakterií *Escherichia coli* kmene DH5a v médiu s filipinem.**

Růstová křivka byla měřena pro bakterie kultivované v tekutém LB médiu s 0 μM, 1 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM a 20 μM filipinem při teplotě 37 °C a intenzitě třepání 200 rpm. Absorbance byly zaznamenávány každých 30 minut po dobu 4 h.

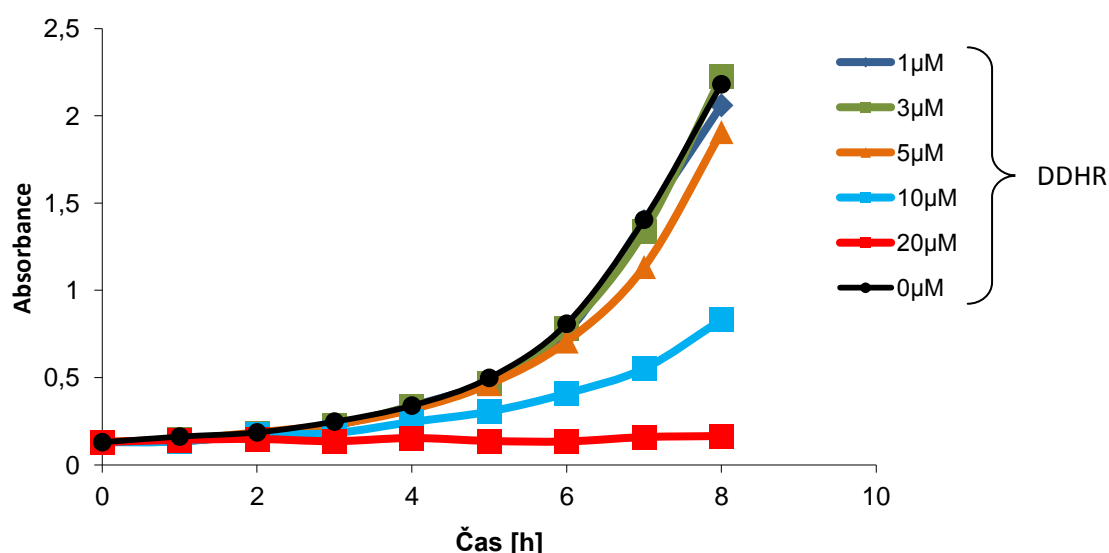
Růstové křivky bakteriálních kultur mají tvar exponenciály. Všechny naměřené hodnoty se jak u kultur v médiu s DDHR (Graf 14), tak i u kultur s filipinem (Graf 15) víceméně shodují s kontrolní kulturou v médiu bez přídavku makrolidu. Hodnoty naměřené u kultur inkubovaných s přídavkem makrolidů se od kontrolní hodnoty odchyluje maximálně o 12,6 % (v případě 1 μM filipinu), což není významný rozdíl i vzhledem k tomu, že se v tomto případě jedná o odchylku absorbance naměřenou u bakteriální kultury s nízkou koncentrací makrolidu. U vyšších koncentrací je odchylka menší. Jedná se tedy pravděpodobně o nepatrně pomalejší růst kultury způsobený manipulací při měření a vnějšími podmínkami.

Ze srovnání křivek je patrné, že DDHR ani filipin v měřených koncentracích neinhibují růst bakteriálních kultur.



### 5.4.1.2 Vliv makrolidů na kvasinky *Sacharomyces cerevisiae* (kmen EGY48)

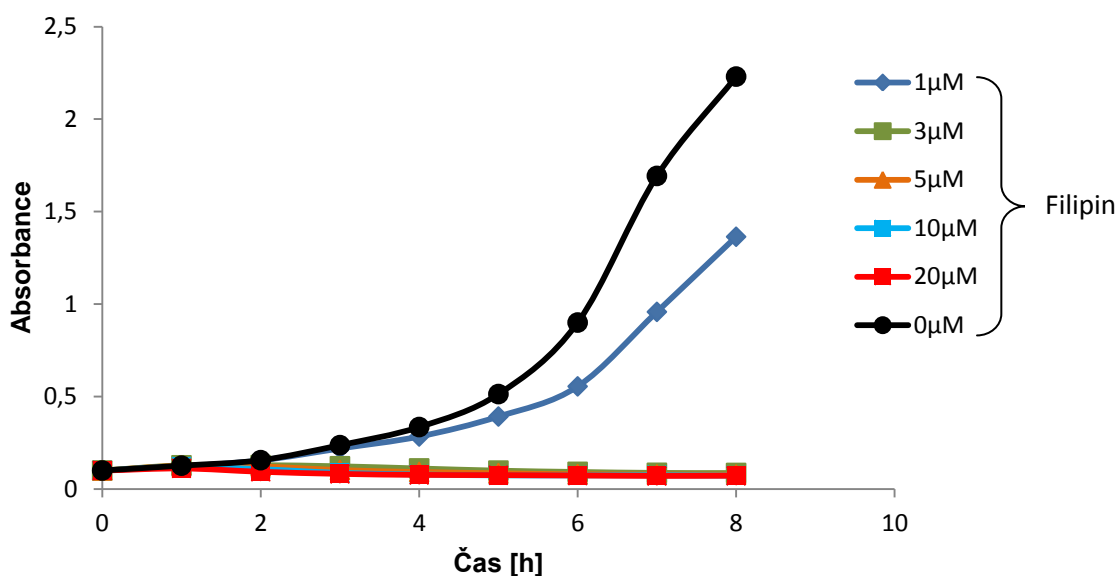
Růst kvasinkových kultur *Saccharomyces cerevisiae* kmene EGY48 byl sledován jako závislost optické denzity kultur na čase. Měření probíhalo po dobu osmi hodin, přičemž absorbance měřené při 600 nm ( $A_{600}$ ) byly měřeny na spektrofotometru každou hodinu. Celkem tedy bylo provedeno osm měření. Kultivace probíhala při 30 °C, pH 6 a intenzitě třepání 200 rpm. Z naměřených hodnot byly sestrojeny růstové křivky. Kvasinky byly 24 h před experimentem zaočkovány do tekutého média a ponechány kultivovat na třepačce při teplotě 30 °C. Před vlastním měřením byly kultury zaočkovány do tekutého média na hodnotu absorbance 0,1. Od šestého měření bylo nutné vzorky ředit, protože hodnoty absorbance překročily hodnotu 0,7.



**Graf 16: Růstová křivka kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* kmene EGY48 v médiu s DDHR.**

Růstová křivka byla měřena pro kvasinky kultivované v tekutém YPAD médiu s 0 μM, 1 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM a 20 μM DDHR při teplotě 30 °C a intenzitě třepání 200 rpm. Absorbance byly zaznamenávány každou hodinu po dobu 8 h.

Z grafu (Graf 16) je zřejmé, že kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmene EGY48 jsou vůči DDHR velmi citlivé. Již při 5–10 μM molární koncentraci DDHR je možné zaznamenat výraznou inhibici růstu kultury. U 20 μM koncentrace DDHR se projevilo snížení absorbance, což by mohlo být vysvětleno množstvím rozpadlých buněk v suspenzi.



**Graf 17: Růstová křivka kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* kmene EGY48 v médiu s filipinem.**

Růstová křivka byla měřena pro kvasinky kultivované v tekutém YPAD médiu s 0 μM, 1 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM a 20 μM filipinem při teplotě 30 °C a intenzitě třepání 200 rpm. Absorbance byly zaznamenávány každou hodinu po dobu 8 h.

Filipin má na kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmene EGY48 větší toxický účinek než DDHR, jak je vidět z Grafu 16 a 17. Již 1 μM koncentrace filipinu zřetelně inhibuje růst kultury. V koncentracích filipinu od 3 μM je růst zastaven úplně a dochází k poklesu absorbance, tedy k rozpadu buněk.

### 5.4.2 Toxicita pro savčí buňky

V současné době se podstatná část výzkumu provádí na savčích buňkách pro objasnění dějů, které probíhají v lidském těle. Pro případné budoucí využití DDHR v medicíně, diagnostice nebo jako fluorescenční sondy je velmi důležité popsat jeho vliv na různé typy savčích buněk.

Ke studiu toxicity DDHR pro savčí tkáňové kultury byl použit kit firmy Molecular Probes LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit, který poskytuje dvoubarevnou fluorescenční metodu založenou na detekci intracelulární esterázové aktivity a integrity plasmatické membrány. U živých buněk dochází po přidání nefluorescenčního

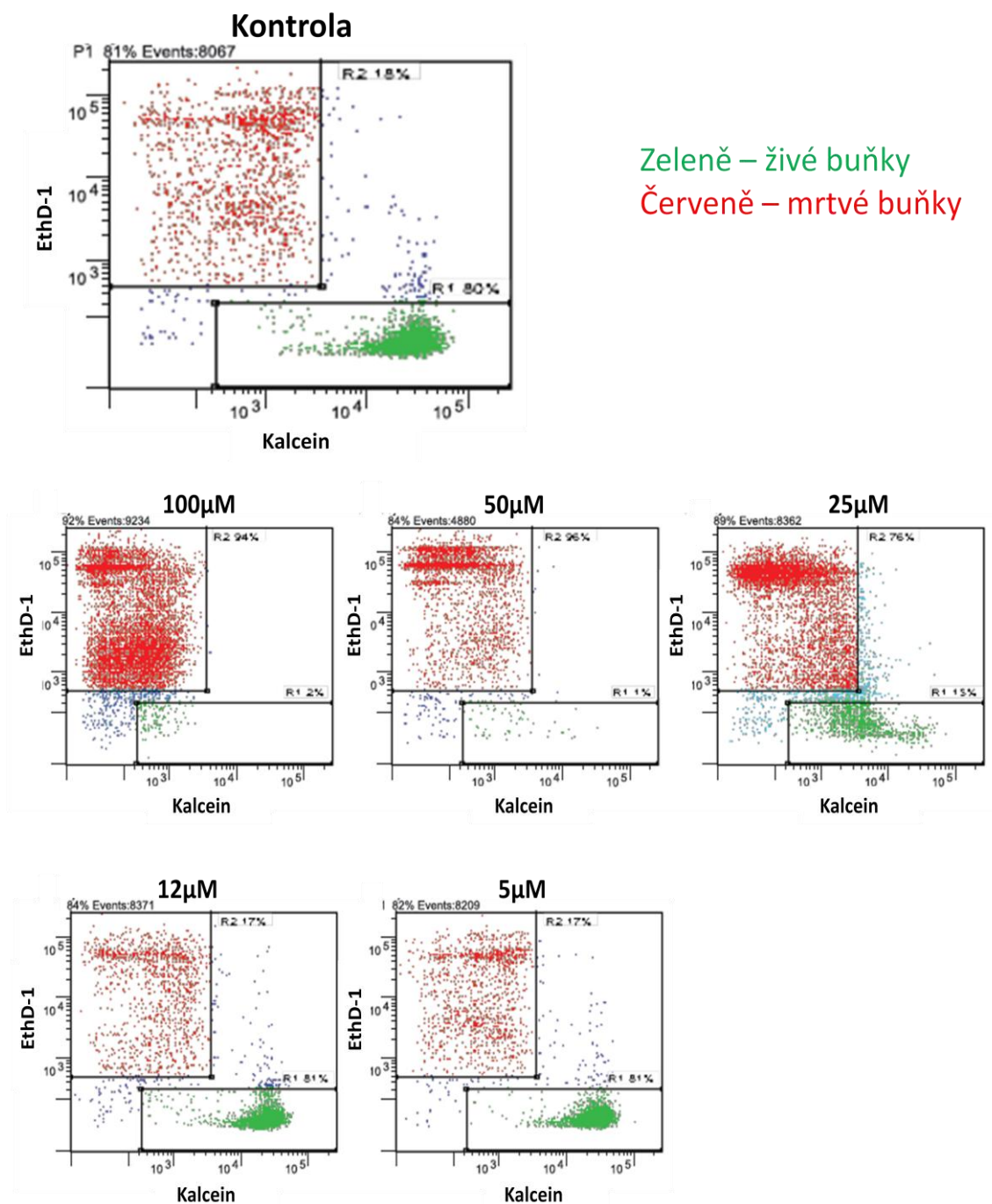
kalceinu AM k jeho přeměně na fluorescenční kalcein. U mrtvých buněk k této konverzi nedochází. Živé buňky lze tedy dobře rozpoznat podle zeleného fluorescenčního signálu v jejich cytoplasmě. Naopak ethidium homodimer-1 (EthD-1) vstupuje do buněk porušenou plasmatickou membránou a po interkalaci do DNA se jeho intenzita fluorescence zvýší asi 40krát. Mrtvé buňky lze tedy dobře rozpoznat podle červeně svítících jader. Analýza počtu takto označených mrtvých a živých buněk v tkáňové kultuře inkubované s DDHR byla provedena pomocí průtokové cytometrie.

#### 5.4.2.1 Buněčná linie Jurkat

Toxicita DDHR pro buněčnou linii Jurkat byla stanovena pomocí kitu LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit na průtokovém cytometru.

Průtoková cytometrie je jednou z metod, která umožňuje analýzu buněk v buněčné populaci. Umožňuje počítání a diferencování buněk (případně jiných vhodných částic) dle jejich velikosti, vnitřní strukturovanosti (granularity) nebo pomocí fluorescenčně značených markerů. Buňky protékají úzkou kapilárou, jsou odděleny do mikroskopických kapek a prochází laserovým paprskem, přičemž tento paprsek je jimi rozptylován. Rozptýlený signál je snímán jednak v úhlu 20 ° (Forward scatter), kterým se určuje velikost částic, jednak v úhlu 90° (Side scatter), což odráží vnitřní strukturovanost buněk (granularitu). Kromě těchto parametrů lze měřit i fluorescenční markery. Po obarvení buněk vhodnými fluorescenčními sondami lze determinovat počet buněk, které exprimují značenou molekulu.

Buňky linie Jurkat byly inkubovány s 100μM, 50μM, 25μM, 12μM a 5μM DDHR po dobu 2 hodin ve 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubaci s makrolidem byla T-buněčná linie Jurkat ponechána se sondami LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit 15 minut v termostatickém inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) a následně charakterizována pomocí průtokového cytometru. Cytometr byl nastaven na měření kanálů pro A488 a A594. Naměřená data byla zpracována softwarem GateLogic.



**Obr. 26: Analýza podílu živých a mrtvých buněk u buněčné linie Jurkat po inkubaci s DDHR pomocí průtokové cytometrie.**

Buňky linie Jurkat byly inkubovány 2 h s různými koncentracemi DDHR. Značení pomocí kitu LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit. Zeleně jsou znázorněny živé metabolicky aktivní buňky, červeně mrtvé buňky.

Koncentrace DDHR	Populace živých buněk	Populace mrtvých buněk
<b>100<math>\mu</math>M</b>	2 %	94 %
<b>50<math>\mu</math>M</b>	1 %	96 %
<b>25<math>\mu</math>M</b>	15 %	76 %
<b>12<math>\mu</math>M</b>	81 %	17 %
<b>5<math>\mu</math>M</b>	81 %	17 %
<b>kontrola</b>	80 %	18 %

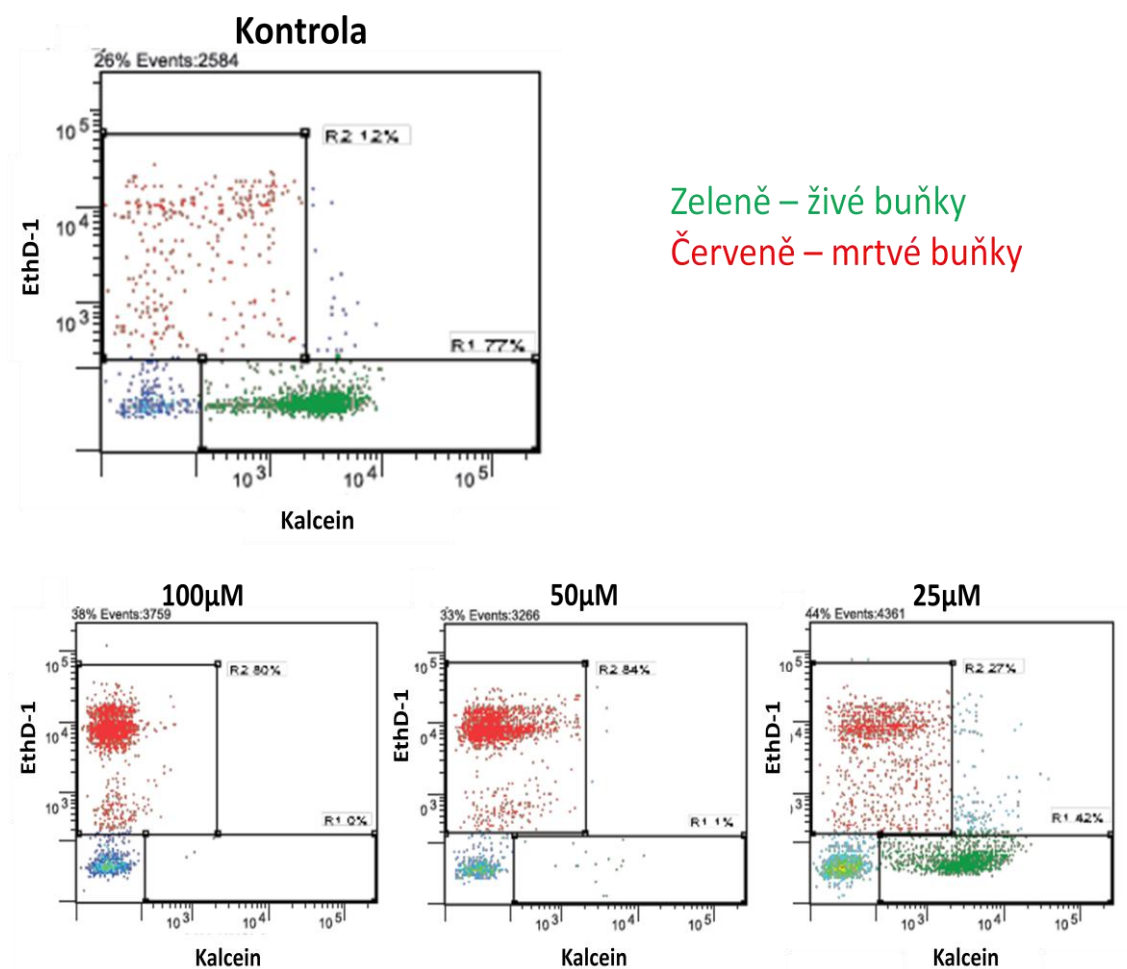
**Tab. 4:** Statistické zpracování podílu živých a mrtvých buněk Jurkat inkubované s různými koncentracemi DDHR.

Analýza byla provedena softwarem GateLogic. Gaty byly nastaveny na kontrole.

Z uvedených FACS diagramů (Obr. 26) i tabulky (Tab. 4) je zřejmé, že koncentrace DDHR do 12  $\mu$ M není pro buňky Jurkat toxická. Podíl mrtvých a živých buněk je pro tyto koncentrace srovnatelný s buňkami neinkubovanými s DDHR. Ve 25 $\mu$ M koncentraci DDHR je již vidět prokazatelný nárůst mrtvých buněk, u 50 $\mu$ M a 100 $\mu$ M koncentrace jsou již prakticky všechny buňky mrtvé. Zdá se, že ve 100 $\mu$ M koncentraci se rozpadají samotná jádra buněk, jelikož podíl částic, které jsou EthD-1 barveny méně intenzivně, je vyšší než u 50 $\mu$ M koncentrace.

### 5.4.2.2 Buněčná linie primárních kožních fibroblastů

Pomocí stejného kitu LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit byl analyzován poměr živých a mrtvých buněk linie primárních fibroblastů po 2 h inkubace se 100 $\mu$ M, 50 $\mu$ M a 25 $\mu$ M DDHR.



**Obr. 27: Analýza podílu živých a mrtvých buněk primárních fibroblastů po inkubaci s DDHR pomocí průtokové cytometrie.**

Primární kožní fibroblasty byly inkubovány po dobu 2 h s různými koncentracemi DDHR. Značení pomocí kitu LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit. Zeleně jsou znázorněny živé metabolicky aktivní buňky, červeně mrtvé buňky.

Koncentrace DDHR	Populace živých buněk	Populace mrtvých buněk
<b>100<math>\mu</math>M</b>	0 %	80 %
<b>50<math>\mu</math>M</b>	1 %	84 %
<b>25<math>\mu</math>M</b>	42 %	27 %
<b>kontrola</b>	77 %	12 %

**Tab. 5:** Statistické zpracování podílu živých a mrtvých buněk primárních kožních fibroblastů inkubovaných s 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M a 100 $\mu$ M koncentrací DDHR.

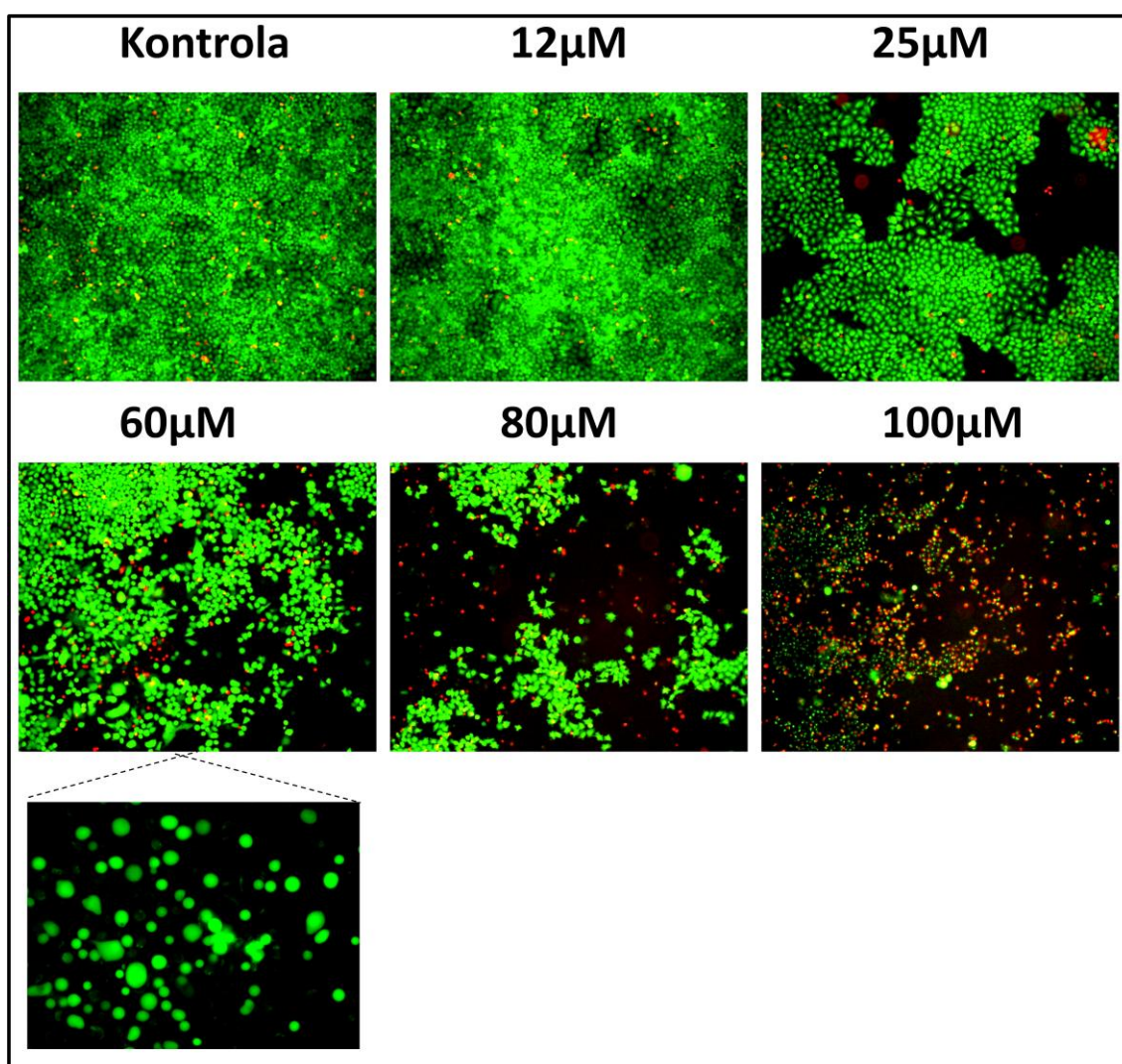
Analýza byla provedena softwarem GateLogic.

Po srovnání viability leukemických suspenzních buněk Jurkat (Tab. 4) a primárních fibroblastů (Tab. 5) je zřejmé, že primární buňky jsou více odolné vůči působení DDHR. Ještě ve 25 $\mu$ M koncentraci DDHR je podíl živých buněk poměrně značný (42 % z celkového počtu naměřených událostí).



### 5.4.2.3 Buněčná linie HeLa

Stejným kitem LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit byly barveny i adherentní buňky HeLa po 2h inkubaci s 12 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 60 $\mu$ M 80 $\mu$ M a 100 $\mu$ M DDHR. Buňky byly po inkubaci pozorovány pomocí fluorescenční mikroskopie. Zeleně jsou označeny živé buňky, červeně mrtvé buňky.



**Obr. 28: Tkáňová kultura buněk HeLa po inkubaci s různými koncentracemi DDHR.**

Ve výřezu u 60 $\mu$ M koncentrace je detail morfologie HeLa buněk po inkubaci. Barvení pomocí kitu LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit. Zelený signál je přítomen v živých metabolicky aktivních buňkách, červený signál značí mrtvé buňky s propustnou plasmatickou membránou (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv 10x).



Již 25 $\mu$ M koncentrace DDHR má toxický vliv na HeLa buňky. V této koncentraci se buňky začínají smršťovat a ztrácí vzájemné spojení. V 60 $\mu$ M koncentraci je možné pozorovat zakulacené neadherované buňky (uveden detail zakulacených buněk s ještě neporušenou membránou). Ve 100 $\mu$ M koncentraci již téměř žádné buňky nejsou živé.

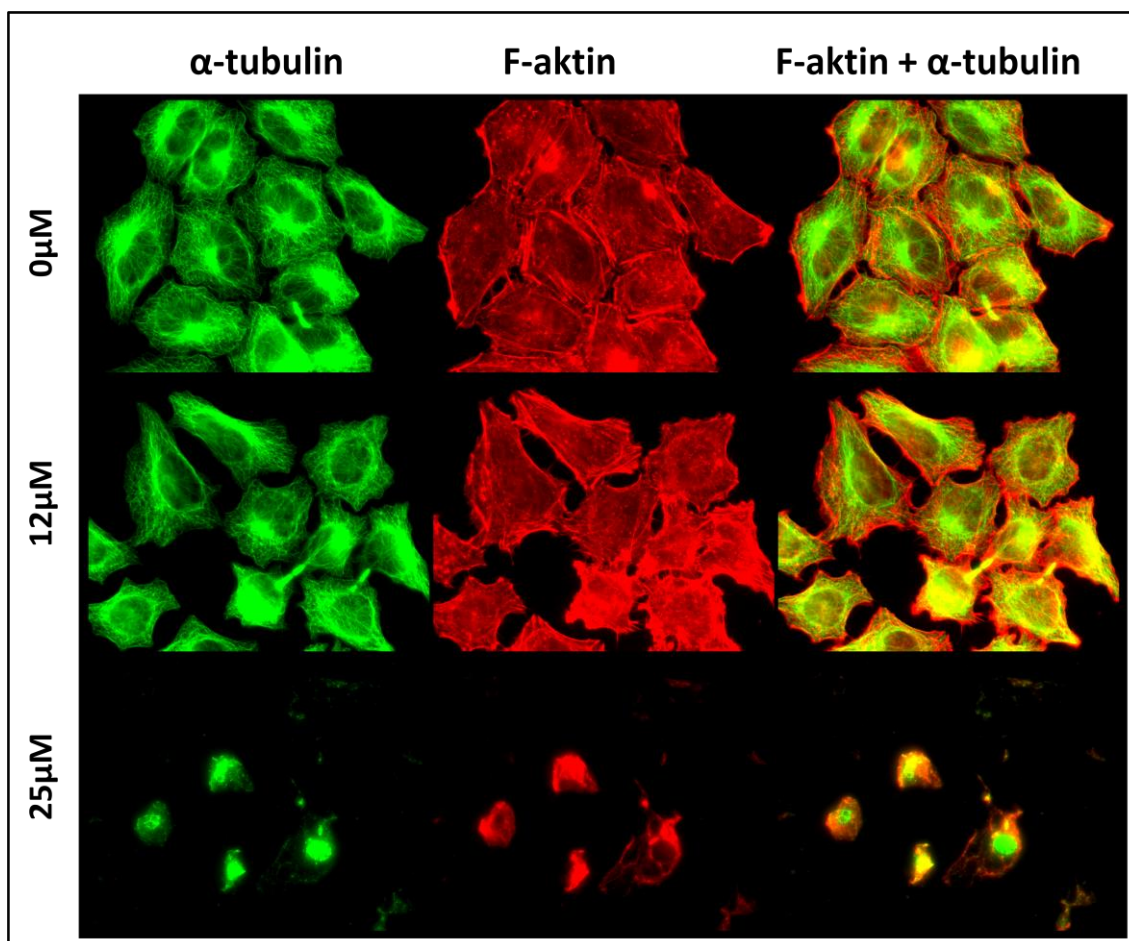
Zdá se, že adherentní transformované buňky HeLa jsou k účinkům DDHR méně citlivé než primární fibroblasty nebo transformované buňky Jurkat. Poměrně nízký podíl červeně zbarvených buněk na obrázku (Obr. 28) je způsoben postupem během přípravy vzorků, který zahrnuje odstranění média po inkubaci s DDHR a promytí buněk PBS. V této fázi byla část mrtvých buněk odstraněna.

### 5.4.3 Vliv DDHR na aktinový a tubulinový cytoskelet

Během studia vlivu DDHR na savčí tkáňové kultury se projevovalo zmenšování buněk po inkubaci s DDHR. Byly tedy provedeny experimenty ke zjištění vlivu DDHR na aktinový a tubulinový cytoskelet u savčích buněk.

HeLa buňky byly inkubovány 2 h v bezsérovém DMEM médiu s 12 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 75 $\mu$ M a 100 $\mu$ M koncentrací DDHR v termostatickém inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Ke kontrolním buňkám bylo přidáno pouze DMSO a to ve stejném objemu jako byl objem DDHR (v zásobním roztoku DMSO) pro nejvyšší přidávanou koncentraci.

Poté byly buňky fixovány formaldehydem a barveny značeným faloidinem-Alexa Fluor 594, který se váže na F-aktin, a myší monoklonální protilátkou proti  $\alpha$ -tubulinu. Tato primární protilátka byla vizualizována kozí antimyší sekundární protilátkou IgG konjugovanou s Alexa Fluor 488.



**Obr. 29: Vliv DDHR na aktinový a tubulinový cytoskelet u buněčné linie HeLa.**

Buňky byly inkubovány v bezsérovém DMEM médiu s různými koncentracemi DDHR. Tubulinový cytoskelet (zeleně) byl vizualizován myší monoklonální protilátkou proti  $\alpha$ -tubulinu a sekundární koží antimyší IgG protilátkou konjugovanou s Alexa Fluor 488. Aktinový cytoskelet (červeně) byl vizualizován značeným faloidinem-Alexa Fluor 594 (fluorescenční mikroskop Cell<sup>R</sup>, objektiv 100x).

DDHR má vliv na buněčný cytoskelet již ve 12 $\mu$ M koncentraci, kdy buňky ztrácí vzájemný kontakt a celkově se zmenšují. Ve 25 $\mu$ M koncentraci DDHR je již většina buněk uvolněna z podložního sklíčka (Obr. 29). Zbývající buňky jsou celkově menší, F-aktin téměř úplně chybí a tubulin se koncentruje v perinukleárních shlucích. Při vyšších testovaných koncentracích (50–100 $\mu$ M koncentrace DDHR), ztratily prakticky všechny buňky kontakt se sklíčkem a nebyly v tomto experimentu, který zahrnoval několikanásobné promytí, téměř pozorovatelné.

Stejný experiment byl proveden i inkubací buněk s filipinem pro porovnání toxicity DDHR s tímto používaným makrolidem. Z výsledků (výsledky zde nejsou uvedeny) bylo zřejmé, že filipin je pro savčí buňky mnohem toxičtější. Po inkubaci buněk

s 1  $\mu$ M filipinem začínala být pozorovatelná depolymerace tubulinu, při 10  $\mu$ M koncentraci byl aktinový a tubulinový cytoskelet již téměř depolymerovaný. Morfologie buněk inkubovaných s 10  $\mu$ M filipinem byla velmi podobná buňkám inkubovaným s 25  $\mu$ M DDHR.

#### 5.4.4 DDHR a indukce buněčné apoptózy

U některých toxinů bylo prokázáno, že jsou schopny indukovat apoptózu. Apoptóza je proces programované buněčné smrti. Jedná se o přísně regulovaný děj, na jehož konci je buňka odstraněna takovým způsobem, že nedochází k poškození okolních buněk v tkáni ani k aktivaci systémové nebo lokální imunitní odpovědi. Ve studii Stodůlková et al. (2011) je uvedeno, že DDHR je právě jedním z toxinů, které indukují proces apoptózy. Z mých pokusů prováděných na buňkách, které byly inkubovány s DDHR, se však zdálo, že buňky vstupují přímo do nekrózy. Proto byla pomocí průtokové cytometrie a analýzy DNA ověřena schopnost DDHR indukovat programovanou buněčnou smrt.

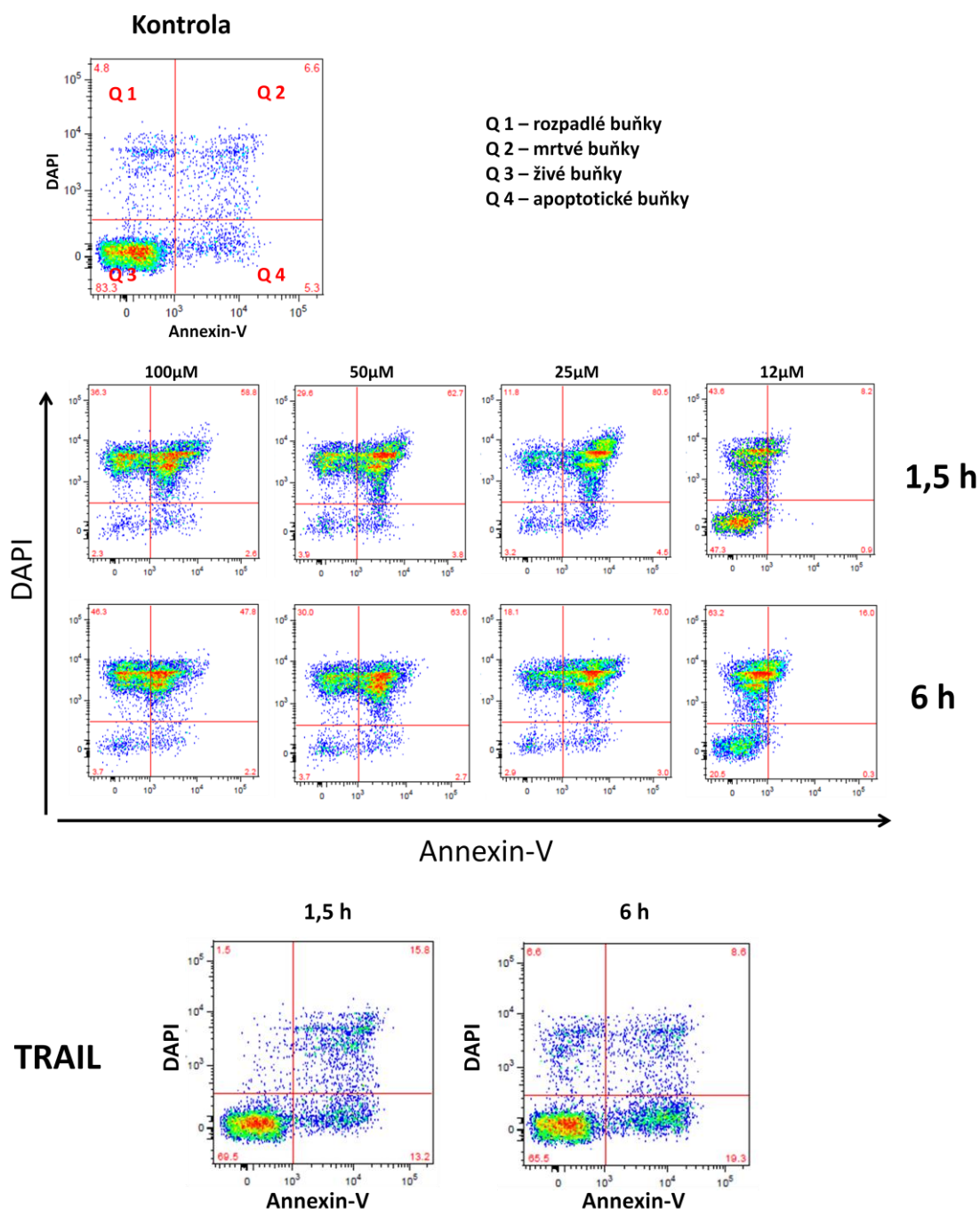
Jedním z typů detekce apoptotických buněk průtokovou cytometrií je metoda založená na značení fosfatidylserinu, který je u apoptotických buněk exponován ve vnějším listu plasmatické membrány, zatímco fosfatidylserin u fyziologických buněk je lokalizován pouze ve vnitřním listu membrány. Přítomnost fosfatidylserinu na povrchu testovaných buněk je zjišťována vazbou fluorescenčně značeného Annexinu-V. K potvrzení celistvosti a funkčnosti plasmatické membrány se využívá PI nebo DAPI, které se váží na nukleové kyseliny a zároveň nepronikají neporušenou membránou. PI nebo DAPI tedy značí hlavně nekrotické buňky s porušenou plasmatickou membránou. Za apoptotické buňky lze považovat ty, které jsou značeny Annexinem-V, avšak které jsou zároveň negativní pro signál PI/DAPI.

Suspenzní buňky transformované linie Jurkat byly inkubovány v médiu RPMI 1640 po dobu 1,5 h, 3,5 h, 4,5 h a 6 h s 12  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M a 100  $\mu$ M DDHR v termostatickém inkubátoru při 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Po inkubaci byly buňky značeny DAPI a Annexinem-V (Dyomics 647) pro detekci apoptózy či nekrózy. Pro srovnání apoptotického působení DDHR byly některé buňky inkubovány s cykloheximidem, který inhibuje proteosyntézu a indukuje apoptózu, a cytokinem TRAIL, který vazbou na TRAIL-receptor přímo

spouští apoptózu. Tato pozitivní kontrola byla využita pro správné nastavení gatování populace živých, apoptotických a nekrotických buněk.

Cytometr byl nastaven na měření kanálu pro DAPI, Dyomics 647 a Cascade Yellow.

Ve FACS diagramech (Obr. 30) jsou uvedena data pouze pro inkubaci po dobu 1,5 h a 6 h.



**Obr. 30: Analýza apoptotických buněk linie Jurkat po inkubaci s DDHR pomocí průtokové cytometrie .**

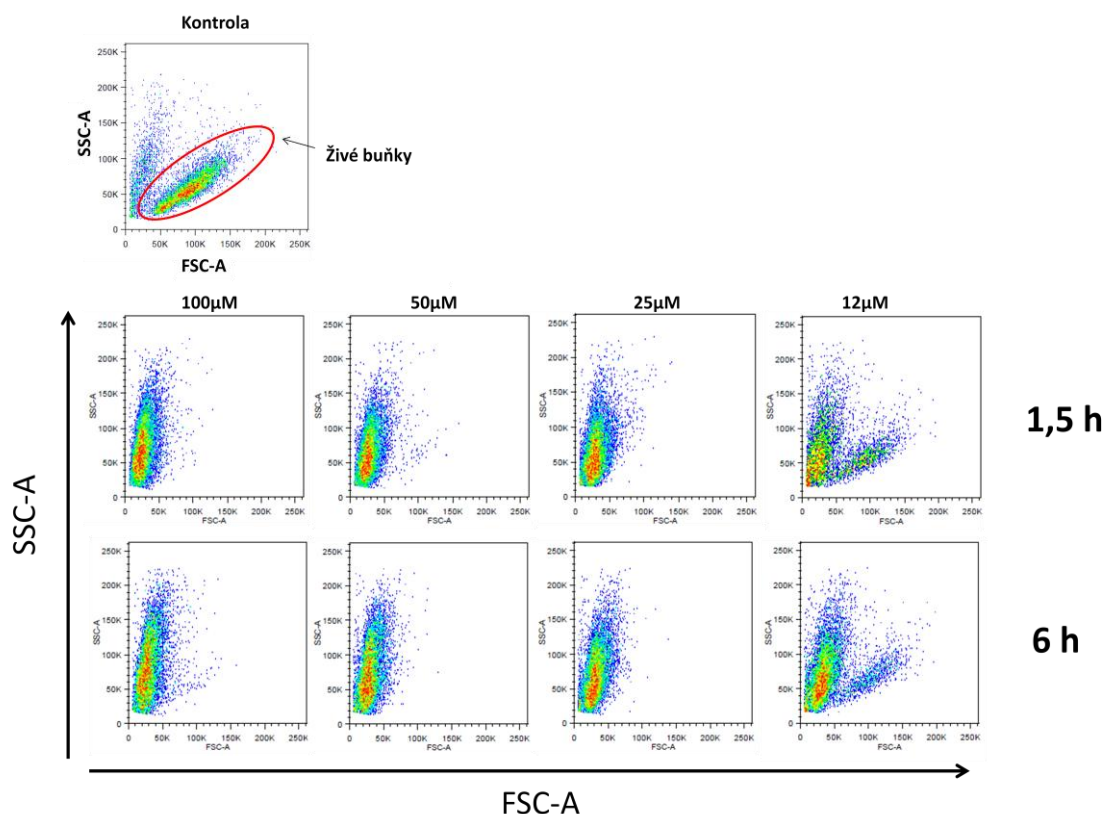
Buňky byly inkubovány s různými koncentracemi DDHR nebo s cykloheximidem a TRAIL. Na obrázku jsou znázorněny reprezentativní výsledky buněk inkubovaných s DDHR po dobu 1,5 h a 6 h. Buňky byly značeny Annexin-V konjugovaným s Dyomics 647 a DAPI. Data jsou vynesena formou dot-plotů.

Výstupy z FACS analýzy musely být softwarově kompenzovány kvůli přesvěcování barevných kanálů.

Z uvedených FACS diagramů (Obr. 30) je zřejmé, že DDHR způsobuje nekrózu buněk a jejich rozpad. U buněk, které byly inkubovány s 25–100  $\mu$ M koncentrací DDHR, není po 1,5 h pozorovatelná téměř žádná živá populace. U buněk inkubovaných s 12  $\mu$ M DDHR je populace částečně živá, avšak apoptotická populace zde není detekována. Naopak většina buněk je pozitivní pro DAPI. Tento výsledek je možné interpretovat tak, že již při 12  $\mu$ M koncentraci DDHR dochází k narušení permeability plasmatické membrány testovaných buněk (propustnost pro DAPI), která při vyšších koncentracích dostupuje takové míry, že do buněk proniká i mnohem větší protein Annexin-V, který se zde váže na fosfatidylserin.

Při porovnání FACS diagramů buněk inkubovaných s DDHR a buněk inkubovaných s TRAIL a cykloheximidem je zřejmé, že buňky ovlivněné DDHR nevykazují žádné známky apoptózy. U kontroly je téměř stejný podíl apoptotických buněk jako u buněk ovlivněných DDHR, kromě 12  $\mu$ M koncentrace DDHR, kde téměř žádné buňky nejsou značeny pro Annexin-V. Naopak u buněk inkubovaných s TRAIL je jasně vidět nárůst populace apoptotických buněk v kvadrantu Q4. Zdá se také, že vliv DDHR na buňky není příliš časově závislý. Poměr živých a mrtvých buněk je velmi podobný u inkubace buněk s DDHR 1,5 h, 3,5 h, 4,5 h a 6 h. Pouze u buněk inkubovaných s 12  $\mu$ M koncentrací DDHR je po šesti hodinách patrný úbytek počtu živých buněk.

Vynesením FACS diagramů pro SSC-A a FSC-A bylo zjištěno, zda je velikost a celková granularita buněk ovlivňována délkou inkubace a koncentrací DDHR.



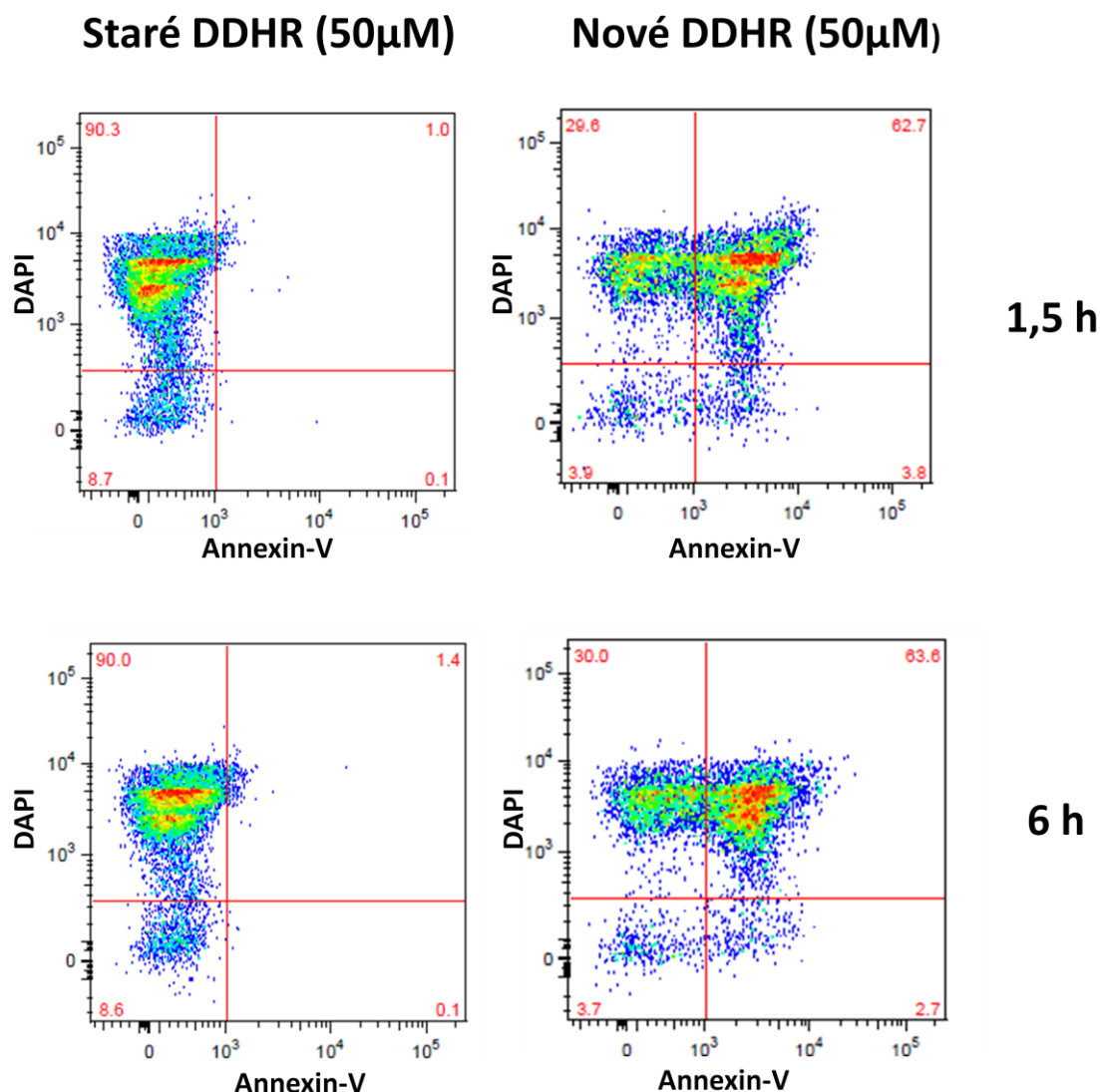
**Obr. 31: Analýza morfologie buněk linie Jurkat po inkubaci s DDHR pomocí průtokové cytometrie.**

Změna tvaru buněk je vyjádřena vynesemím FSC-A vůči SSC-A pro buňky inkubované s různými koncentracemi DDHR. Data jsou vynesena formou dot-plotů.

Z FACS diagramů (Obr. 31) je zřejmé, že DDHR silně ovlivňuje strukturu buněk. Ty se znatelně zmenšují. Mezi koncentracemi 100 μM, 50 μM a 25 μM není v morfologii buněk podle těchto výsledků prakticky žádný rozdíl. 12 μM koncentrace DDHR ponechává pouze malou populaci živých buněk. Délka inkubace s DDHR morfologii buněk podle těchto výsledků prakticky neovlivňuje.

V jiném experimentu (výsledná data zde nejsou uvedena) byly buňky Jurkat inkubované 20, 40, 60, 80, 100 a 120 min s nižšími koncentracemi DDHR (1 μM, 5 μM, 12 μM, 18 μM a 25 μM) než ve výše uvedeném experimentu. Pro detekci apoptózy byl použit Apoptosis assay kit-FITC, který obsahuje Annexin-V (FITC) a PI. Ani pro tyto koncentrace nebyla zjištěna indukce apoptózy DDHR. Buňky vstupovaly přímo do nekrózy podobně jako ve výše uvedeném experimentu.

K získání informací o případné ztrátě aktivity DDHR během jeho dlouhodobějšího skladování byly buňky inkubovány také s DDHR extrahovaného z bakterií 2 roky před pokusem („staré DDHR“). Izolovaný prášek byl skladován v zábrusové nádobě v - 20 °C. Pro srovnání bylo k pokusu využito i čerstvě izolované DDHR („nové“ DDHR). Buňky byly inkubovány se „starým“ i „novým“ DDHR v 50 $\mu$ M koncentraci po dobu 1,5 h a 6 h a značeny Annexinem-V a DAPI.



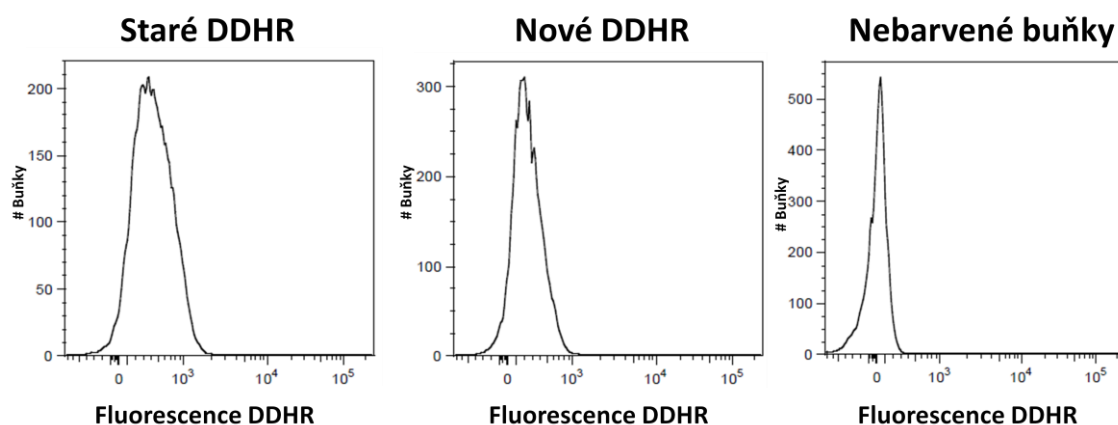
**Obr. 32:** Analýza apoptotických buněk linie Jurkat po inkubaci s nově vyizolovaným DDHR (nové DDHR) a DDHR, které bylo 2 roky skladováno v - 20 °C ve formě prášku (staré DDHR) pomocí průtokového cytometru.

Na obrázku jsou uvedena data pro buňky inkubované s 50 $\mu$ M „novým“ a „starým“ DDHR po dobu 1,5 h a 6 h. Buňky byly značeny Annexin-V konjugovaným s Dyomics 647 a DAPI. Data jsou vynesena formou dot-plotů.



Aktivita „starého“ DDHR v 50 $\mu$ M koncentraci není srovnatelná s aktivitou „nového DDHR“ ve stejné koncentraci (Obr. 32). Naopak je srovnatelná s aktivitou 12 $\mu$ M „nového“ DDHR (Obr. 30). Podobně jako u 12 $\mu$ M koncentrace nového DDHR nejsou buňky obarveny Annexinem-V, ale pouze DAPI.

Během měření na průtokovém cytometru byla kromě výše uvedené fluorescence DAPI a Annexinu-V přímo zaznamenána i fluorescence DDHR měřením ve fluorescenčním kanálu pro sondu Cascade Yellow, která je spektrálně nejbližší fluorescenci DDHR.



**Obr. 33: Analýza intenzity fluorescence nově izolovaného DDHR (nové DDHR) a DDHR, které bylo 2 roky skladováno při - 20 °C ve formě prášku (staré DDHR).**

Analýza byla provedena na buňkách linie Jurkat, fluorescence DDHR byla snímána v kanálu pro sondu Cascade Yellow. Data jsou vynesena formou histogramů.

Buňky inkubované s asi 2 roky skladovaným DDHR vykazují silnější fluorescenční signál ve srovnání s čerstvě izolovaným „novým“ DDHR (Obr. 33).

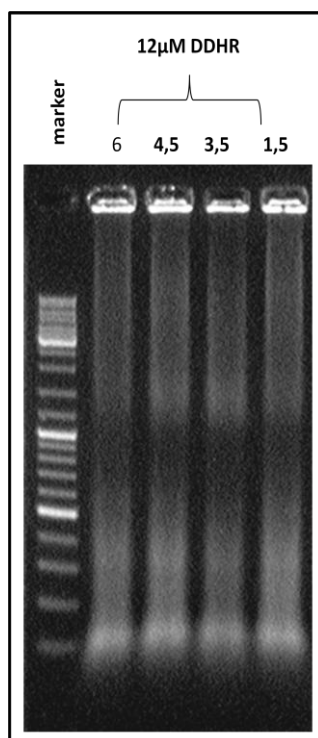
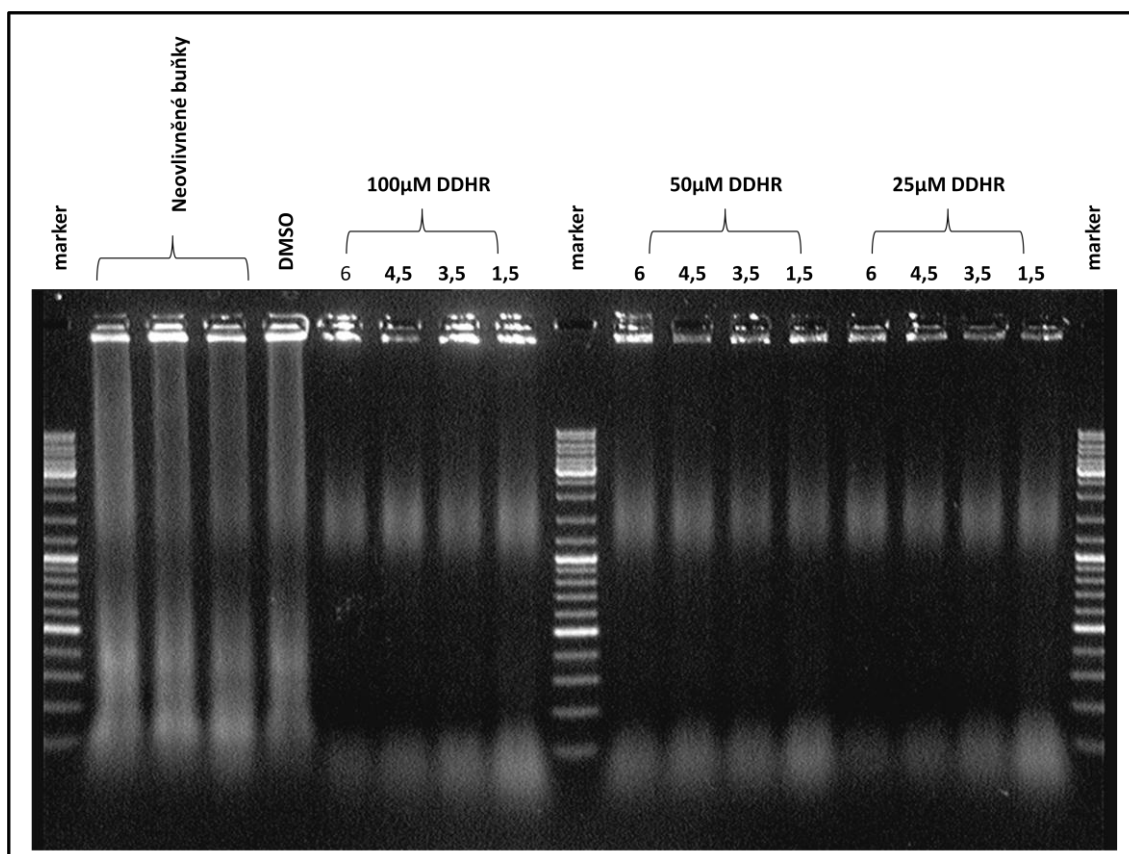


### 5.4.5 Analýza nukleových kyselin buněk inkubovaných s DDHR

V článku Stodůlková et al. (2011) byla schopnost DDHR indukovat apoptózu u buněk HL60 hodnocena na základě pozorování „apoptotického žebříčku“ na agarózové gelové elektroforéze vyizolovaných nukleových kyselin. „Apoptotický žebříček“ DNA vzniká aktivací specifické DNázy v rámci apoptotické signalizační kaskády. Tato DNáza štěpí DNA mezi nukleosomy na dvouřetězcové fragmenty dlouhé násobky 180 bp. Ve výše uvedených datech z analýzy apoptotických buněk průtokovou cytometrií (Obr. 30) však nebyly detekovány téměř žádné apoptotické buňky. Pro ověření tohoto výsledku byla provedena analýza buněčných nukleových kyselin pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Jednalo se o ty samé buňky, jaké byly charakterizovány pomocí průtokového cytometru (oddíl 5.4.4) a které zbyly po obarvení 200 $\mu$ l alikvót pro průtokovou cytometrii. Buňky byly inkubovány 1,5 h, 3,5 h, 4,5 h a 6 h se 100 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 25 $\mu$ M, 12 $\mu$ M a 0 $\mu$ M koncentrací DDHR v médiu RPMI 1640. Po inkubaci byly buňky lyzovány v hypotonickém prostředí, 5–10 minut povařeny v 97 °C ve vzorkovém pufru a rozděleny pomocí gelové elektroforézy.

Ze získaných výsledků analýzy DNA (Obr. 34) je zřejmé, že v buňkách inkubovaných se 100 $\mu$ M, 50 $\mu$ M a 25 $\mu$ M DDHR zůstaly detekovatelné převážně nukleové kyseliny o velikosti 1000–3000 bp a méně než 200 bp (jedná se s největší pravděpodobností o rRNA a tRNA). Ostatní nukleové kyseliny byly pravděpodobně degradovány včetně mnohem méně stabilní mRNA. Velká část genomové DNA zůstala na startu v jamkách. Žádný „apoptotický žebříček“ viditelný není.



**Obr. 34:** Analýza nukleových kyselin buněk inkubovaných s DDHR pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Buňky byly inkubovány s různými koncentracemi DDHR po dobu 1,5 h, 3,5 h, 4,5 h a 6 h.

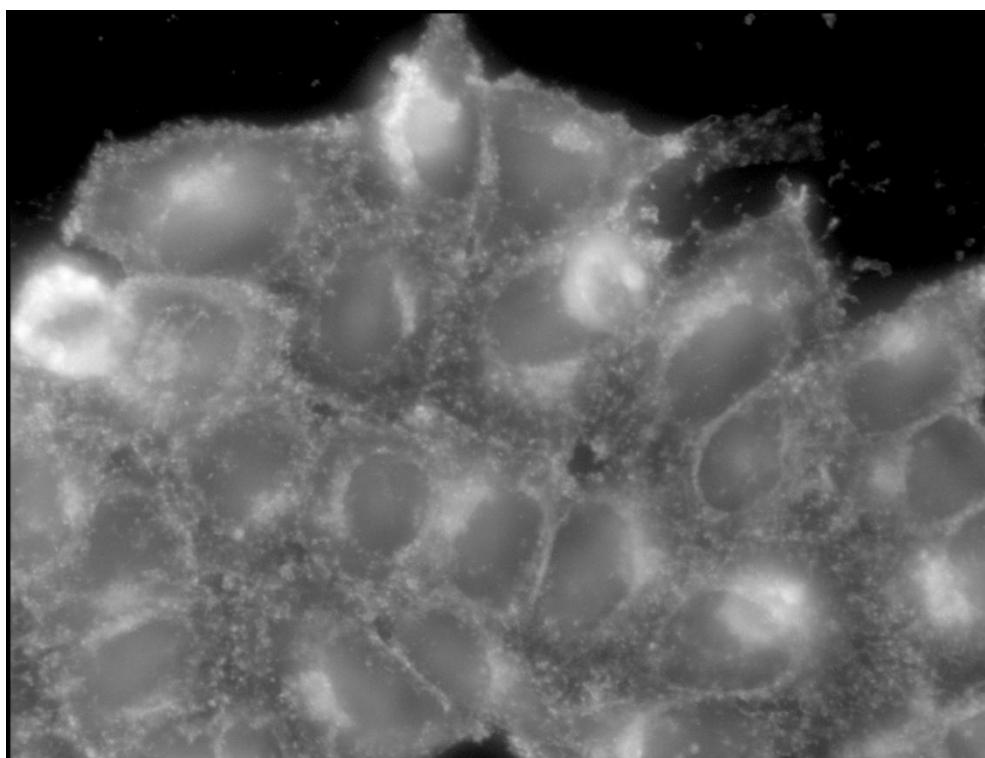
DNA marker – GeneRuler DNA Ladder Mix

## 5.5 Fluorescenční značení buněk metabolitem DDHR

DDHR je bioaktivní látka, která se váže do buněčných membrán a která je zároveň po excitaci UV zářením nebo krátkovlnným modrým světlem fluorescenční. Zdá se tedy, že by DDHR mohl být vhodným fluorescenčním markerem některých membránových organel. Značení buněk bylo prováděno vždy na fixovaných buňkách.

### 5.5.1 Fluorescenční značení HeLa buněk

Membrány fixovaných buněk lze velmi dobře značit pomocí DDHR a následně detekovat jeho fluorescenční signál excitací UV zářením nebo krátkovlnným modrým světelným zářením (vlnové délky 320–410 nm).



**Obr. 35: Značení fixovaných buněk pomocí DDHR.**

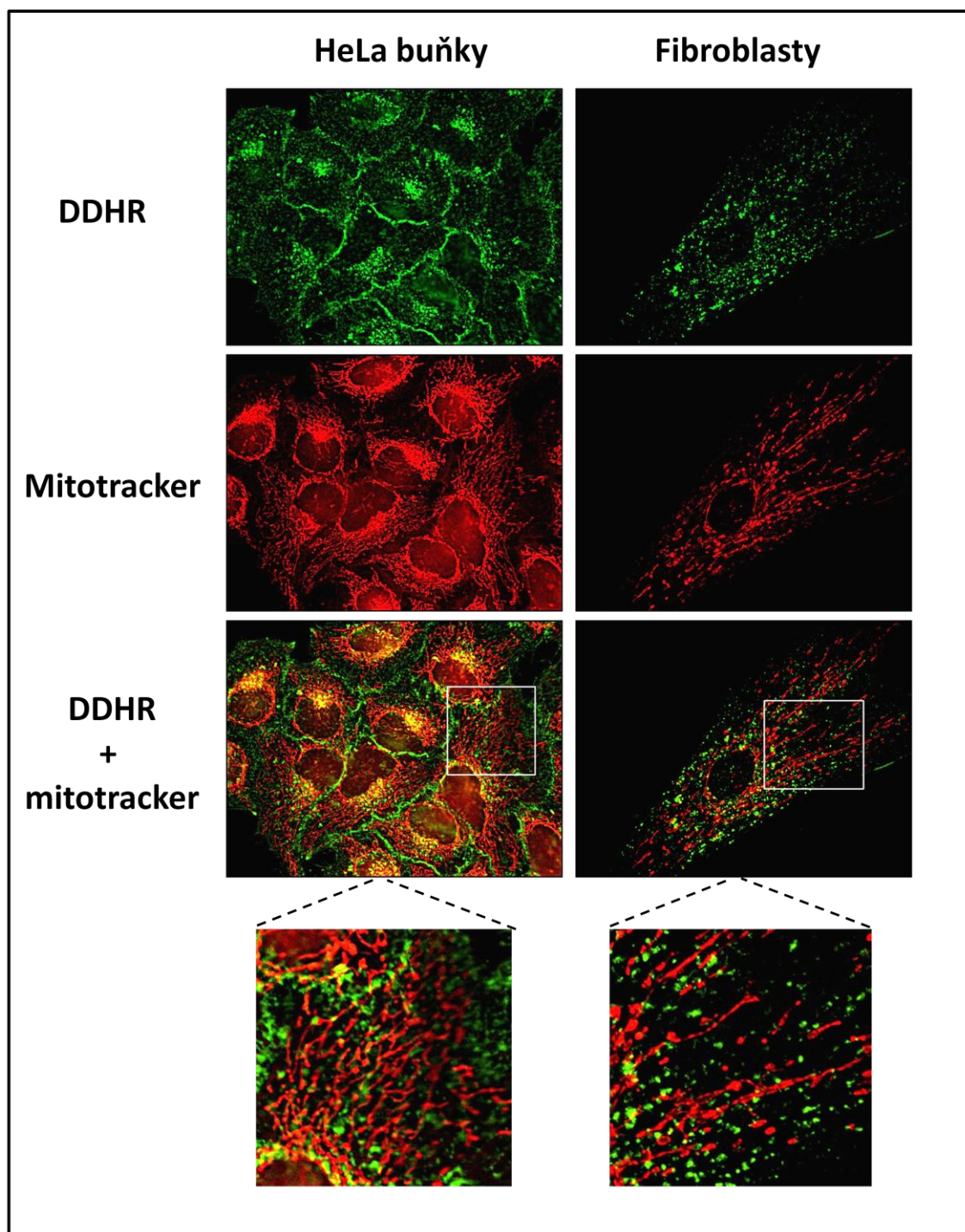
Fixované HeLa buňky byly značeny 14 $\mu$ M DDHR (fluorescenční mikroskop Cell<sup>R</sup>, objektiv 60x).

V celkovém pohledu na HeLa buňky (Obr. 35) DDHR značí velmi dobře především váčkové membránové struktury a již slaběji plasmatickou membránu (identifikace vezikulárních struktur viz dále).

### 5.5.2 Kolokalizace fluorescenčního signálu DDHR s buněčnými organelami

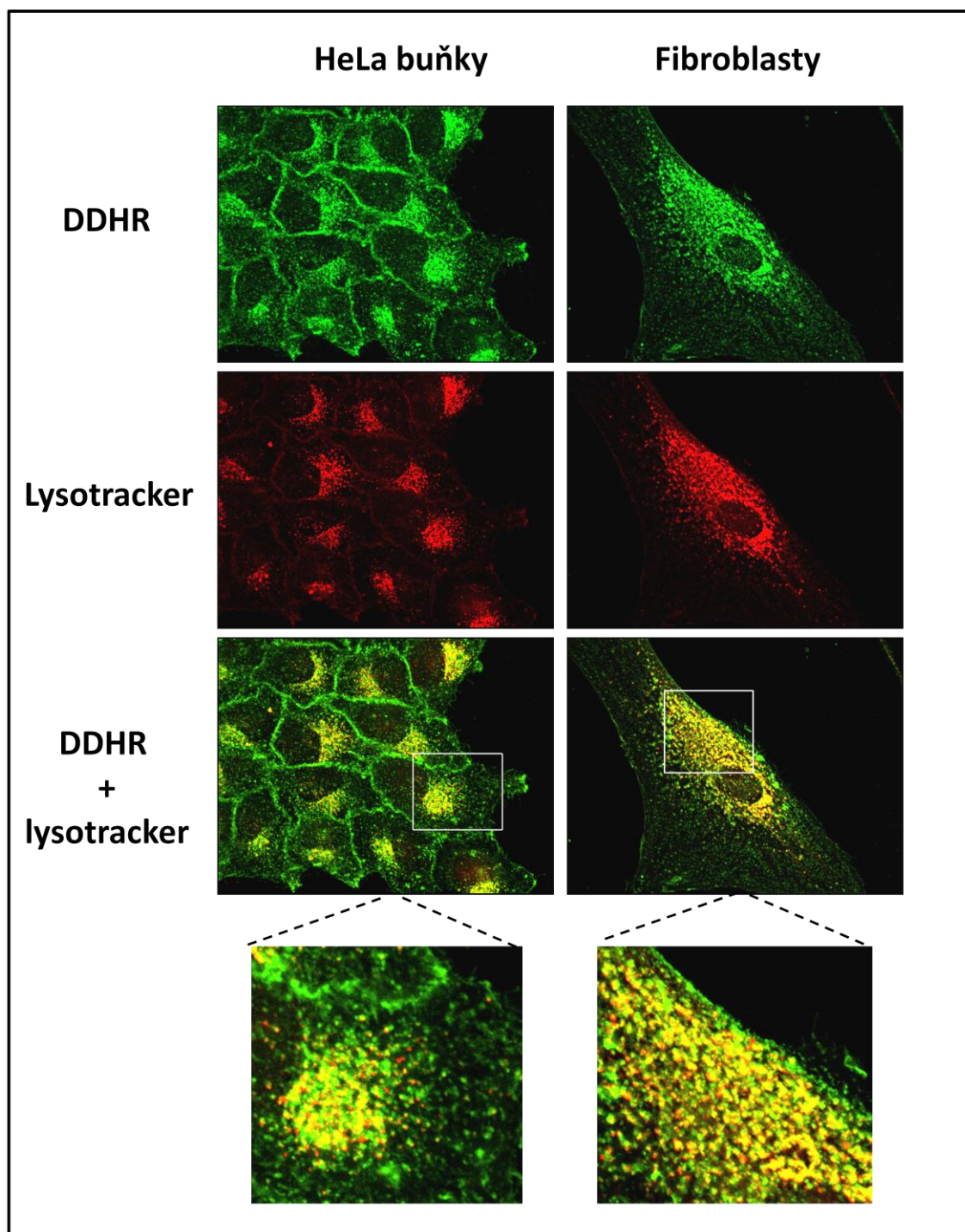
Pro studium kolokalizace byly zvoleny dva buněčné typy lišící se velikostí a chováním v *in vitro* podmínkách: HeLa buňky a primární kožní fibroblasty. Buňky HeLa jsou adenokarcinomového původu, podléhají kontaktní inhibici, vytvářejí celou řadu mezibuněčných spojů a jejich velikost je ve srovnání s fibroblasty poměrně malá (20–30  $\mu\text{m}$ ). Fibroblasty jsou naopak velké, v protaženém tvaru mohou být delší než 100  $\mu\text{m}$ , a výrazně planární. Rozdíl ve tvaru buněk výrazně ovlivňuje distribuci jednotlivých organel. V případě fibroblastů jsou organely rovnoměrně rozprostřeny a díky planaritě je možné většinu z nich pozorovat v jedné rovině zaostření. Pro kolokalizační studie je tento buněčný typ optimální. Oproti tomu HeLa buňky jsou zvláště v konfluentním stavu poměrně vysoké, a proto vyžadují proskenování asi 10 optických řezů v ose Z. Navíc u těchto buněk dochází k akumulaci velkého množství vezikulárních struktur v perinukleární oblasti.

Kolokalizačními studiemi s markery pro různé intracelulární membránové struktury bylo zjišťováno, do kterých membránových buněčných struktur se DDHR váže. MitoTracker, LysoTracker a značený transferin byly aplikovány na živé buňky, ponechány inkubovat 15 minut. Poté byly buňky fixovány (oddíl 4.6). Značení buněčných struktur protilátkami bylo prováděno na již fixovaných buňkách. DDHR pro značení bylo vždy aplikováno ve 100  $\mu\text{M}$  koncentraci na fixované buňky. Vzorky byly snímány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus Cell<sup>R</sup> v několika řezech po 0,4  $\mu\text{m}$  v ose Z. Na všechny snímky byl aplikován tzv. „pixel shift“ (posun zobrazovacího bodu) pro jednotlivé barevné kanály z důvodu mírně odlišné optické dráhy na jednotlivých dichroických zrcadlech. Pro odstranění kontaminujícího signálu pozadí byly snímky upraveny jednoduchou dekonvolucí. Fluorescenční signál z DDHR byl softwarově převeden do „falešné“ zelené barvy, signál z markerů MitoTracker, LysoTracker, LAMP-1, EEA1 a transferin do červené barvy. Žlutá barva ve sloučených obrázcích tedy značí kolokalizaci.



**Obr. 36: Studium kolokalizace DDHR s mitochondriemi (marker MitoTracker).**

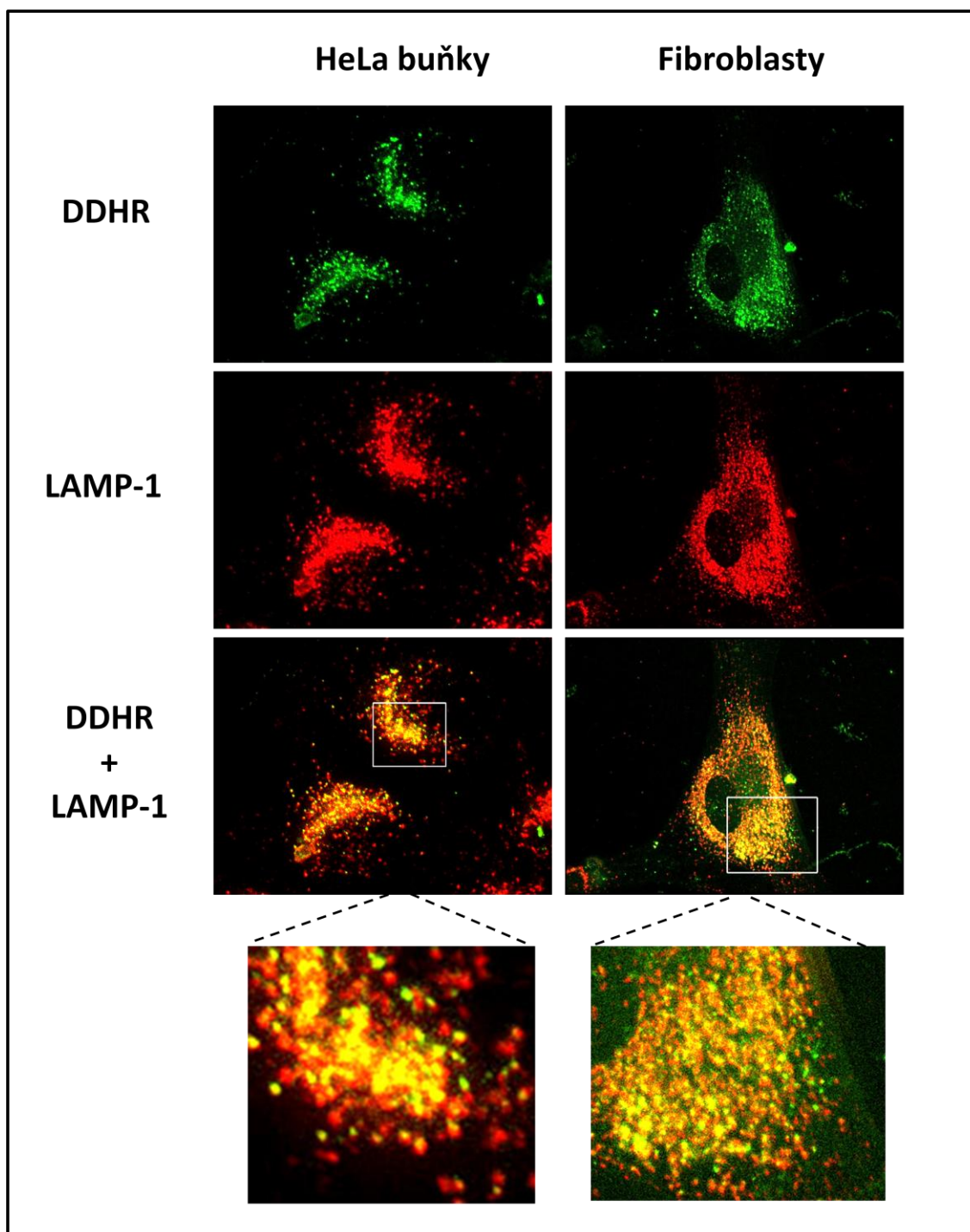
Kolokalizační studie byly provedeny na HeLa buňkách a primárních kožních fibroblastech značených DDHR a MitoTrackerem. Fluorescenční signál DDHR je znázorněn zeleně, signál MitoTrackeru červeně. Žlutá barva je překryvem červené a zelené barvy a vyjadřuje kolokalizaci (fluorescenční mikroskop Cell<sup>R</sup>, objektiv 60x).



**Obr. 37: Studium kolokalizace DDHR s lysozomy (marker LysoTracker).**

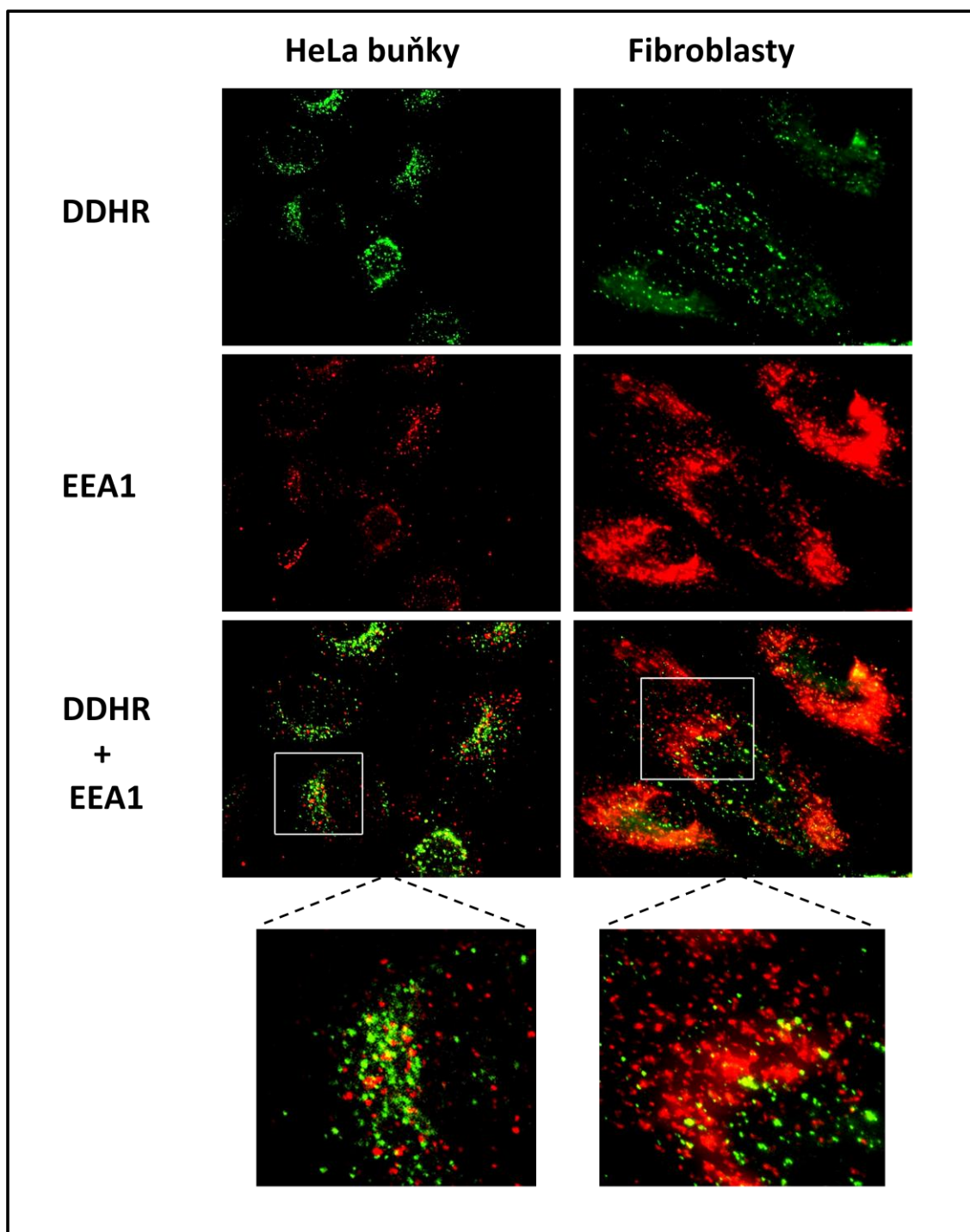
Kolokalizační studie byly provedeny na HeLa buňkách a primárních kožních fibroblastech značených DDHR a LysoTrackerem. Fluorescenční signál DDHR je znázorněn zeleně, signál LysoTrackeru červeně. Žlutá barva je překryvem červené a zelené barvy a vyjadřuje kolokalizaci (fluorescenční mikroskop Cell<sup>R</sup>, objektiv 60x).





**Obr. 38: Studium kolokalizace DDHR s lysozomy (marker LAMP-1).**

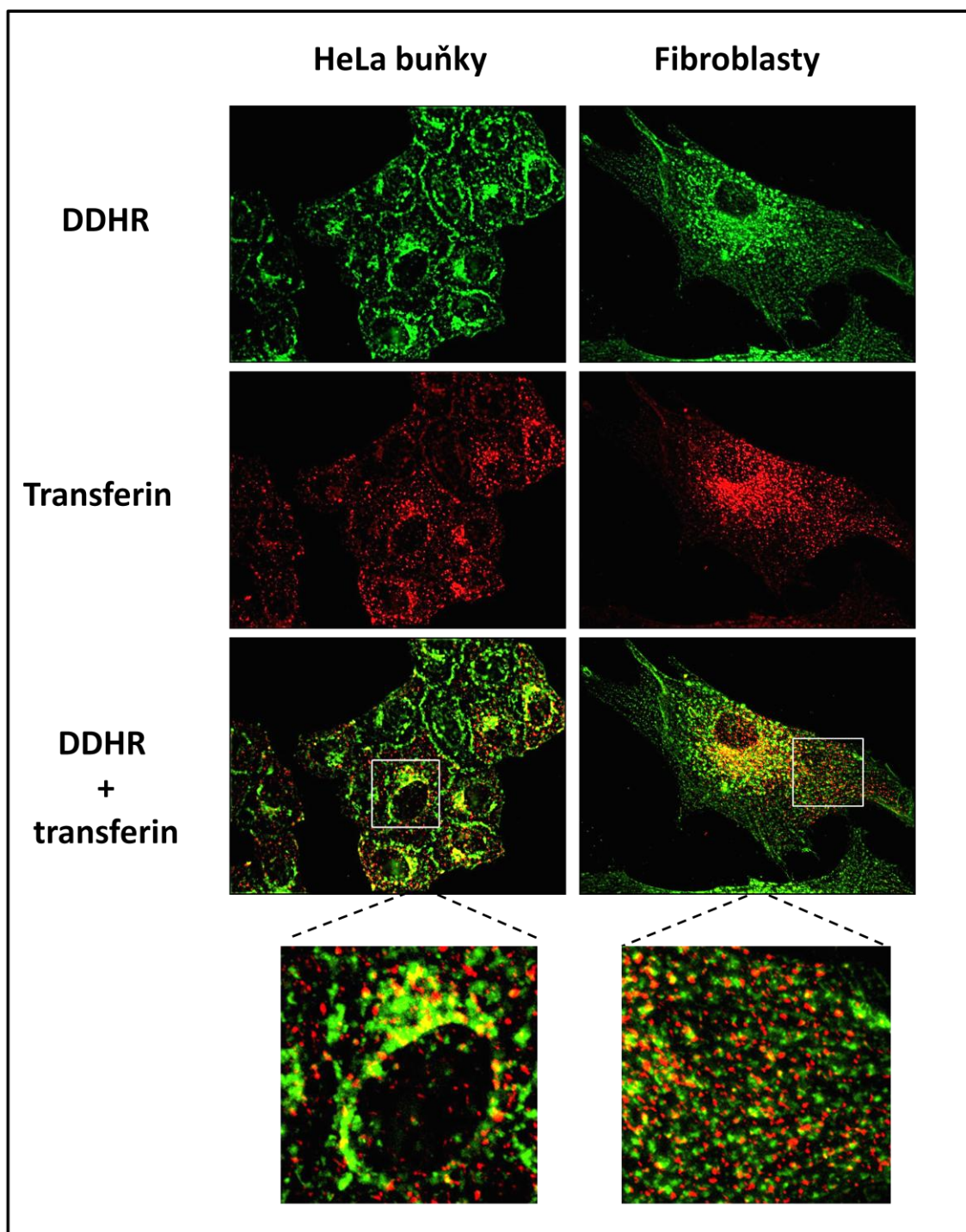
Kolokalizační studie byly provedeny na HeLa buňkách a primárních kožních fibroblastech značených DDHR a pomocí protilátky specifické pro LAMP-1 (markerem lysozomů). Fluorescenční signál DDHR je znázorněn zeleně, signál LAMP-1 červeně. Žlutá barva je překryvem červené a zelené barvy a vyjadřuje kolokalizaci (fluorescenční mikroskop Cell<sup>R</sup>, objektiv 60x).



**Obr. 39: Studium kolokalizace DDHR s časnými endozomy (marker EEA1).**

Kolokalizační studie byly provedeny na HeLa buňkách a primárních kožních fibroblastech značených DDHR a pomocí protilátky specifické pro EEA1 (markerem časných endozomů). Fluorescenční signál DDHR je znázorněn zeleně, signál EEA1 červeně. Žlutá barva je překryvem červené a zelené barvy a vyjadřuje kolokalizaci (fluorescenční mikroskop Cell<sup>R</sup>, objektiv 60x).





**Obr. 40: Studium kolokalizace DDHR s časnými endozomy (marker tranferin).**

Kolokalizační studie byly provedeny na HeLa buňkách a primárních kožních fibroblastech značených DDHR a značeným tranferinem (markerem časných endozomů). Fluorescenční signál DDHR je znázorněn zeleně, signál značeného transferinu červeně. Žlutá barva je překryvem červené a zelené barvy a vyjadřuje kolokalizaci (fluorescenční mikroskop Cell<sup>R</sup>, objektiv 60x).

Z kolokalizačních studií s červeně značeným MitoTrackerem (markerem mitochondrií) (Obr. 36) je zřejmé, že fluorescence DDHR s fluorescencí MitoTrackeru nekolokalizuje. Kolokalizace DDHR s LysoTrackerem který značí kyselé membránové struktury (vesměs tedy většinou lysozomy), je z uvedeného obrázku (Obr. 37) vizuálně patrná. Kolokalizace však není stoprocentní. Část struktur zůstala obarvená pouze LysoTrackerem (červená barva), část obarvená pouze DDHR (zelená barva). To může být způsobeno tím, že marker značí struktury s nízkým pH, které se ve většině nachází právě v lysozomech, některé další organelové struktury se ale také mohou vyznačovat nižším pH ve svém lumen. Právě takové organely nemusí být DDHR značeny. Zdá se však, že DDHR s lysozomy poměrně dobře kolokalizuje.

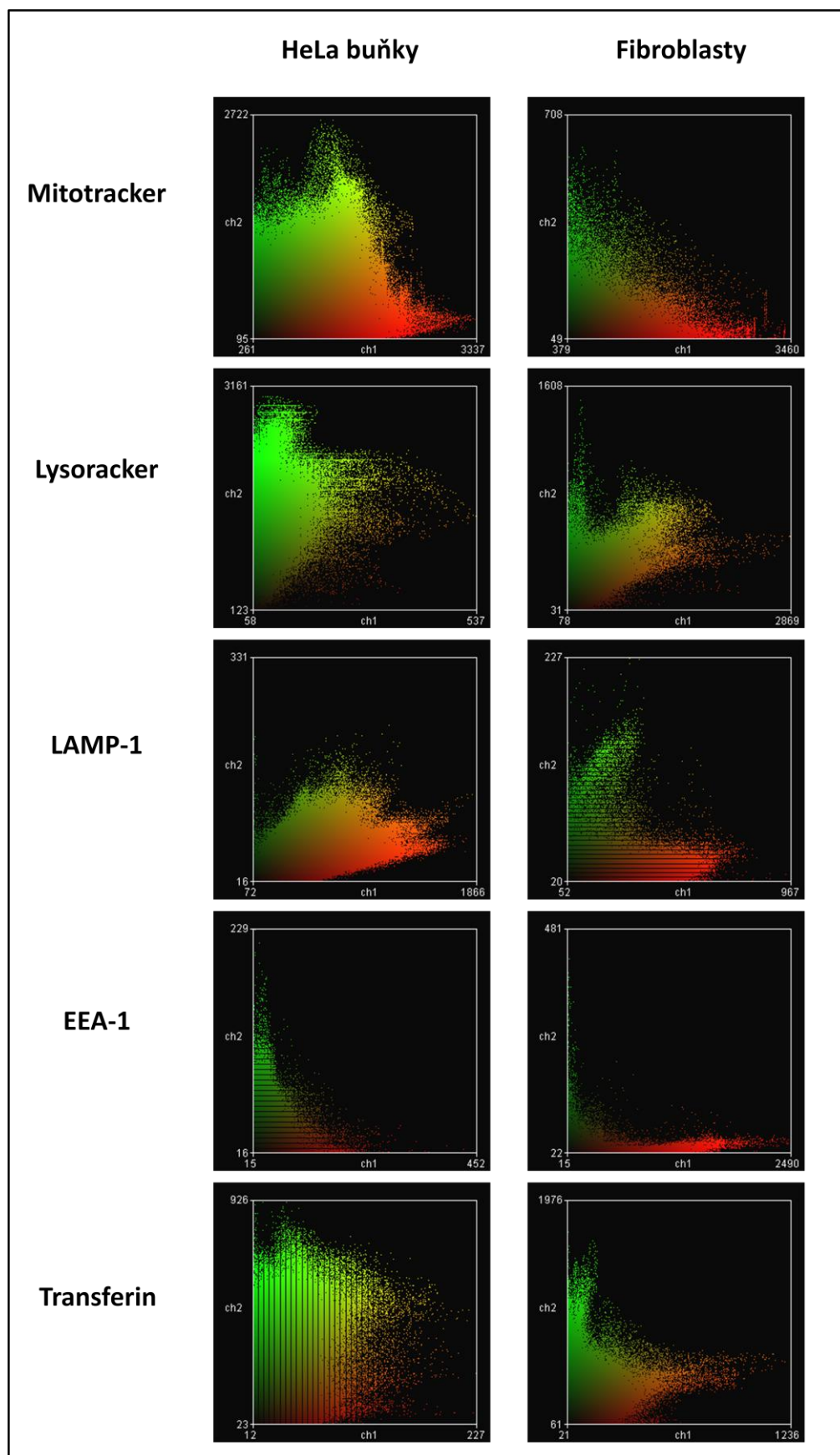
Pro potvrzení vazby DDHR na lysozomy bylo provedeno značení buněk DDHR a myší monoklonální protilátkou specifickou pro LAMP-1, což je protein, který je lokalizován v membráně lysozomů (Obr. 38). U HeLa buněk červený signál z LAMP-1 částečně kolokalizuje se zeleným signálem DDHR. U fibroblastů je tento jev méně zřetelný.

Schopnost vazby DDHR na časné endozomy byla zjišťována inkubací buněk s DDHR a koží polyklonální protilátkou specifickou pro EEA1, což je protein lokalizovaný v membráně časných endozomů (Obr. 39). Z obrázku kolokalizace DDHR s markerem časných endozomů EEA1 je zřejmé, že nedochází ke kolokalizaci - červený a zelený signál je jasně oddělený.

Vazba DDHR na časné endozomy nebyla prokázána ani kolokalizačními studiemi se značeným transferinem (Obr. 40). Transferin je podobně jako EEA1 markerem časných endozomů asociovaných s klatrinovým obalem.

DDHR se váže především na lysozomální struktury (Obr. 37, 38). Mitochondriální membrány zůstávají neznačeny stejně jako časné endozomy obsahující protein EEA1 (Obr. 36 a Obr. 39). DDHR se tedy jeví jako poměrně dobrý marker pro detekci lysozomů.

Při bližším pohledu na obrázky z těchto kolokalizačních pokusů (Obr. 36 až Obr. 40) je možné zaznamenat, že v případě použití protilátek jako markerů organel (LAMP-1, EEA1) mělo DDHR slabší fluorescenční signál než v případě pokusů s MitoTrackerem, LysoTrackerem nebo značeným transferinem. Důvodem je pravděpodobně nutnost permeabilizovat plasmatické membrány pomocí detergentu, aby se protilátky dostaly do buněk. Během permeabilizace dochází k částečné extrakci lipidů z membrán, proto DDHR značí plasmatické membrány takto připravených buněk méně intenzivně.



**Obr. 41: Softwarová analýza kolokalizace DDHR s jednotlivými organelovými markery.**  
 Zeleně je vyneseno fluorescenční signál DDHR, červeně pak fluorescenční signál markerů. Data byla získána z obrázků kolokalizace (Obr. 36 až Obr. 40).

Z vynesných grafů distribuce signálu v jednotlivých kanálech (Obr. 41) je vidět, že v případě LysoTrackeru je zde poměrně velká korelace jeho signálu s DDHR. U HeLa buněk je jasně zřetelná i kolokalizace s LAMP-1, zatímco u fibroblastů je kolokalizace podle tohoto zpracování diskutabilní. U ostatních markerů je kolokalizace poměrně nízká. Překryv zeleného a červeného signálu je patrná i v případě MitoTrackeru a značeného transferinu u HeLa buněk. Tyto grafy je však vždy nutné porovnávat se získanými obrázky. U tohoto typu buněk barvených MitoTrackerem je zdánlivá kolokalizace v perinukleárním prostoru, v němž však dochází k akumulaci mnoha struktur, proto uvedená korelace signálů není směrodatná. Překryvná část červeného a zeleného signálu v grafu distribuce signálu náleží právě k této oblasti. V případě tranferinu je problém s překryvem signálů na membráně, kterou DDHR značí, zároveň zde zůstává i určitá část tranferinu. Vypovídací hodnotu má kolokalizace uvnitř buňky, která je dle vizuálního posouzení obrázku nízká (Obr. 40).

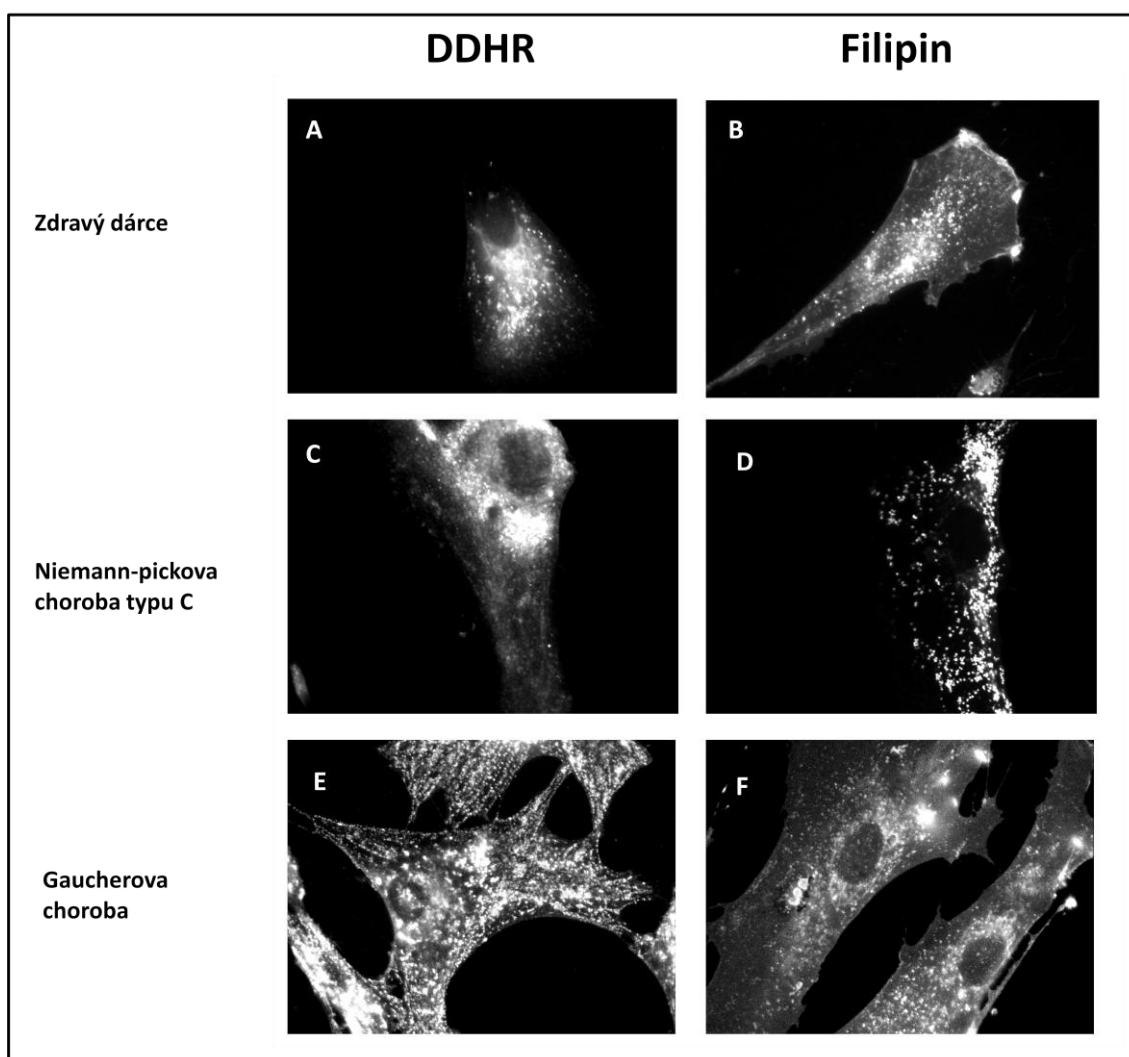
### **5.5.3 Značení buněk získaných z pacientů se střádavými lysozomálními chorobami**

Tzv. filipinové barvení se dnes běžně využívá k diagnostice některých střádavě lysozomálních poruch díky své schopnosti vázat se na cholesterol, který je akumulován v aberantních lysozomech. Toto značení však má své limity a aberantní lysozomy buněk některých pacientů nemusí být filipinem značeny, případně jsou značeny velmi špatně. Navíc filipin má podobné fluorescenční spektrum jako autofluorescence buněk, často je tedy poměrně obtížné odlišit autofluorescenci samotných lysozomů od fluorescence filipinu. Schopnost DDHR značit lysozomy (oddíl 5.5.2) vedl k domněnce, že by mohl být využit podobně jako filipin k diagnostice některých střádavých lysozomálních poruch, navíc bez možných chybných interpretací způsobených nerozeznáním autofluorescence buněk od fluorescence sondy.

Pomocí fluorescenčního mikroskopu Cell<sup>R</sup> bylo provedeno srovnání značení filipinem a DDHR primárních kožních fibroblastů získaných z biopsie pacienta s Gaucherovou chorobou (patologicky střádajících glukocerebrosidy v lysozomech) a chorobou

Niemann-Pickovou typu C (patologicky strádajících cholesterol v lysozomech), stejně tak značení buněk od zdravého dárce.

Značení buněk 100 $\mu$ M DDHR nebo 100 $\mu$ M filipinem bylo prováděno na formaldehydem fixovaných buňkách (oddíl 4.6) získaných od pacientů se strádavě lysozomálními chorobami.



**Obr. 42: Zdravé a patologické kožní fibroblasty značené DDHR nebo filipinem.**

Buňky byly značeny 100 $\mu$ M DDHR (A, C, E) nebo 100 $\mu$ M filipinem (B, D, F). Buňky ze zdravého dárce (A,B), buňky získané z pacienta s Niemann-Pickovou chorobou typu C (C,D), buňky získané z pacienta s Gaucherovou chorobou (E,F). Značení probíhalo na fixovaných buňkách. Na snímky nebyla aplikována dekonvoluce (fluorescenční mikroskop Olympus Cell<sup>R</sup>, objektiv 60x).

Značení fibroblastů DDHR nebo filipinem má u patologií NPC a Gaucherova choroba odlišný charakter (Obr. 42). Zatímco fluorescence filipinu u buněk pacienta s Gaucherovou chorobou je ve velké míře lokalizována především na plasmatické membráně, méně již na aberantních lysozomech (Obr. 42 F), fluorescence DDHR se na

těchto buňkách vyskytuje spíše na aberantních lysozomech než na plasmatické membráně, která je na rozdíl od filipinu značena méně (Obr. 42 E). Značení těchto buněk DDHR je také oproti filipinu jasnější a intenzivnější.

Značení buněk získaných z pacienta s NPC je zřetelnější po aplikaci filipinu, DDHR tyto buňky barví ne příliš odlišně od kontrolních zdravých fibroblastů. Tato barvení potvrzují předpoklad, že fluorescence DDHR je zhasena cholesterolem. Z porovnání Obrázků 42 C, D, E, F je možné vyvodit, že signál z DDHR je pro diagnostické účely Gaucherovy choroby daleko použitelnější, DDHR by tedy mohl v budoucnu představovat dobrý diagnostický nástroj pro tuto chorobu případně jiné střádavé lysozomální poruchy.

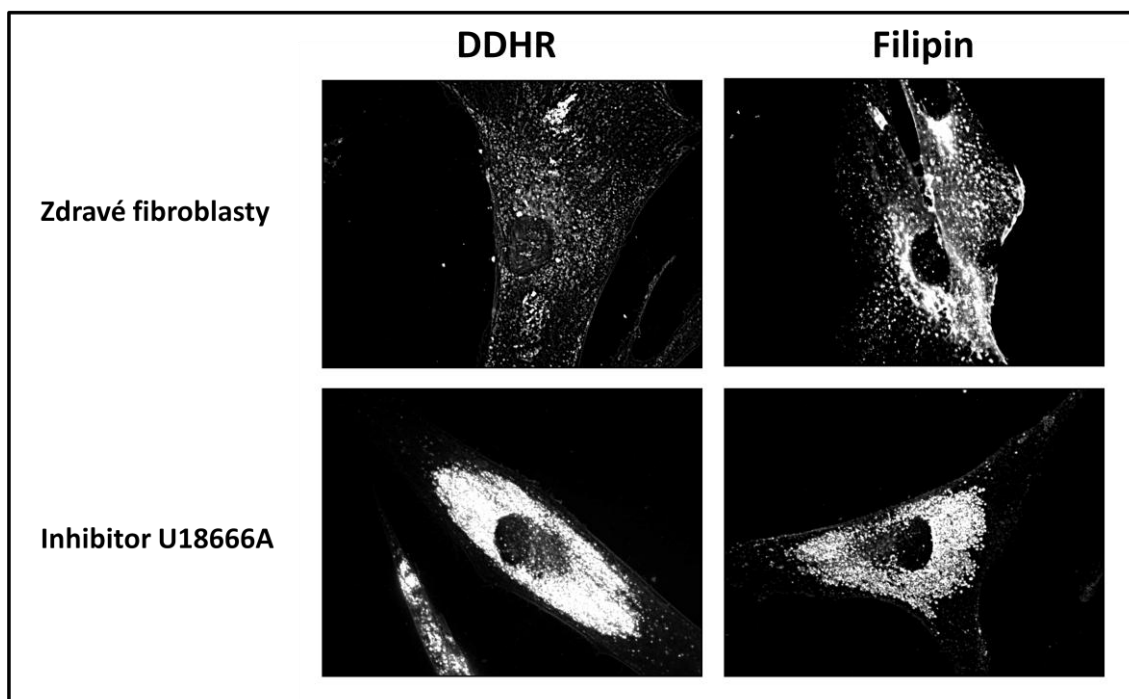
#### **5.5.4 Blokování transportu cholesterolu inhibitorem U18666A**

Inhibitor U18666A je používán k napodobení fenotypu Niemann-Pickovy choroby typu C (NPC). Značení buněk ovlivněných tímto inhibitorem pomocí DDHR mělo přinést informaci o tom, zda distribuce fluorescenčního signálu DDHR bude podobná jako u buněk z pacientů s touto chorobou.

Inhibitor U18666A je amfipatický steroid 3- $\beta$ -[2-(diethylamine)ethoxy]androst-5-en-17-one, který je široce využíván k blokování intracelulárního transportu cholesterolu a napodobuje fenotyp NPC (střádavě lysozomální choroby) blokováním výstupu neesterifikovaného cholesterolu z pozdních endozomů a lysozomů. To vede k jeho akumulaci v těchto organelách. Zároveň inhibuje biosyntézu cholesterolu v buňkách. Mechanismus jeho účinku není přesně znám, pravděpodobně však inhibuje NPC1 protein (Neufeld et al., 1999).

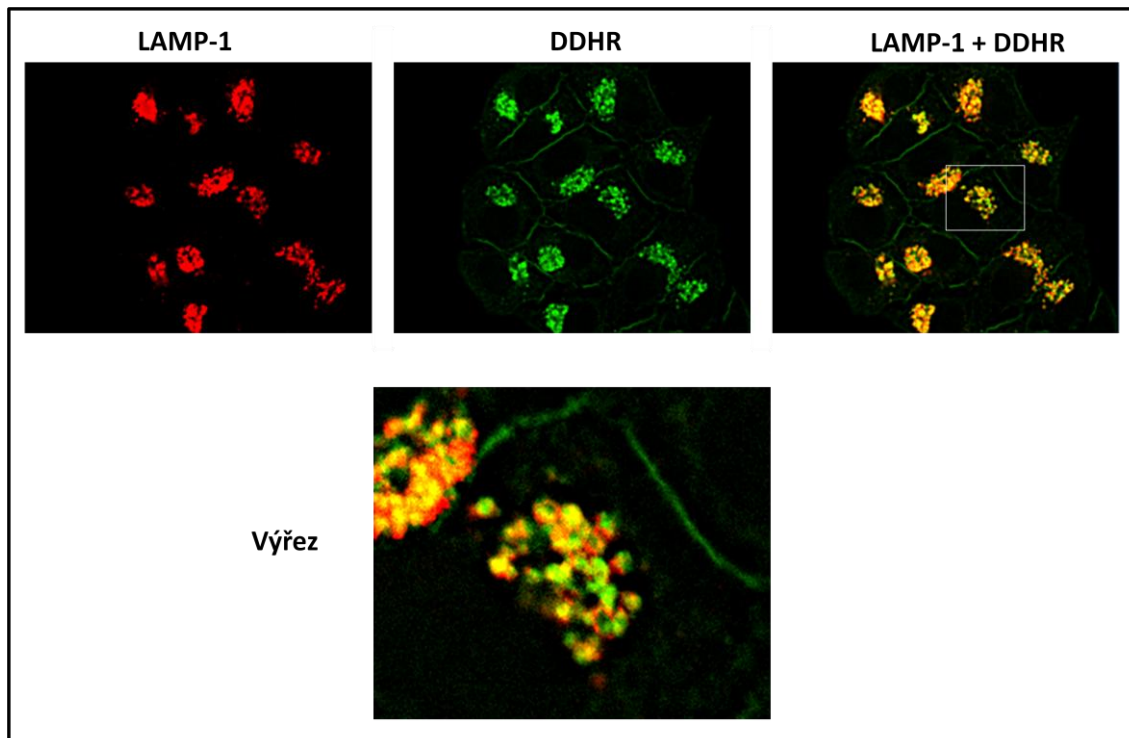
Buňky byly inkubovány s 2,5 $\mu$ M inhibitorem U18666A po dobu 50 hodin v termostatickém inkubátoru (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), fixovány formaldehydem (oddíl 4.6) a značeny 100 $\mu$ M DDHR nebo 100 $\mu$ M filipinem.





**Obr. 43: Značení buněk ovlivněných inhibitorem U18666A pomocí DDHR a filipinu.**

Primární kožní fibroblasty byly inkubovány 50 hodin s inhibitorem U18666A, po inkubaci fixovány a značeny DDHR nebo filipinem. Kontrolní buňky nebyly inhibitorem ovlivněny. Na úpravu snímků byla použita jednoduchá dekonvoluce (fluorescenční mikroskop Olympus Cell<sup>R</sup>, objektiv 60x).



**Obr. 44: Kolokalizace fluorescence DDHR s proteinem asociovaným s lysozomy LAMP-1 na buňkách ovlivněných inhibitorem U18666A.**

Buňky byly fixovány a značeny DDHR (zeleně) a LAMP-1 (protein asociovaný s lysozomy - červeně). (fluorescenční mikroskop Olympus Cell<sup>R</sup>, objektiv 60x).

Fenotyp buněk ovlivněných inhibitorem U18666A není ve srovnání s buňkami získanými z pacienta s NPC totožný ani u značení DDHR, ani u značení filipinem (Obr. 43). DDHR značí buňky pacienta nezřetelně a ne příliš odlišně od kontrolních zdravých fibroblastů (Obr. 42), u buněk s inhibitorem je rozdíl oproti zdravým buňkám podstatný.

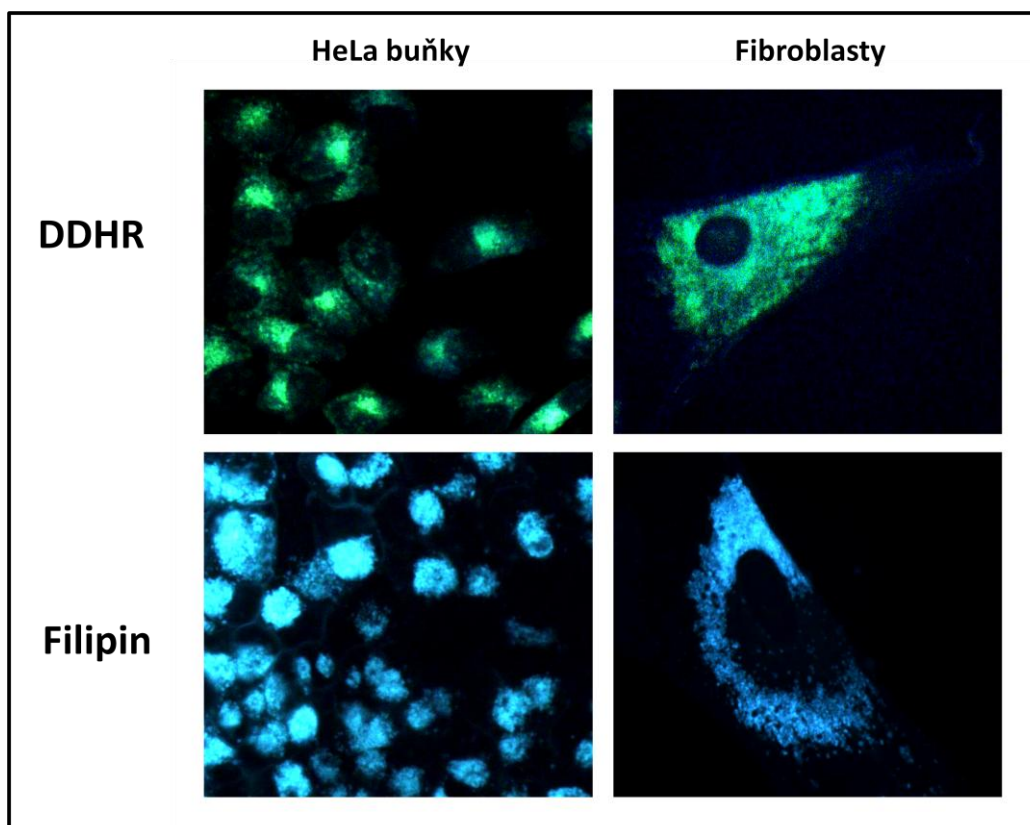
U buněk ovlivněných inhibitorem dochází k akumulaci cholesterolu v endozomálním systému. Fluorescence DDHR je zde velmi výrazná, i přestože by podle dříve získaných výsledků (např. oddíl 5.3.4) měl cholesterol fluorescenci DDHR zeslabovat. Lze ovšem předpokládat, že na lysozomech akumulovaných působením inhibitoru U18666A existují určité mikrodomény s odlišným lipidovým složením. Tento předpoklad potvrzuje i snímek získaný z kolokalizačních pokusů značeného proteinu asociovaného s lysozomy LAMP-1 s fluorescencí DDHR u buněk ovlivněných inhibitorem U18666A (Obr. 44).

V endozomálních buněčných strukturách akumulovaných působením inhibitoru U18666A se zdá, že zde existují určité mikrodomény (Obr. 44). Červený signál z LAMP-1 částečně kolokalizuje s DDHR na značených lysozomech, jsou zde však vidět i oblasti značené pouze DDHR, anebo pouze LAMP-1 existující evidentně na jednom lysozomu, což je nejlépe vidět ve výřezu Obrázku 44. I přestože dochází k akumulaci cholesterolu, je pravděpodobné, že díky přítomnosti mikrodomén různého složení lze tyto struktury značit DDHR, jehož fluorescence je jinak pravděpodobně cholesterolem zhasena.

### 5.5.5 Kolokalizace fluorescence filipinu a DDHR

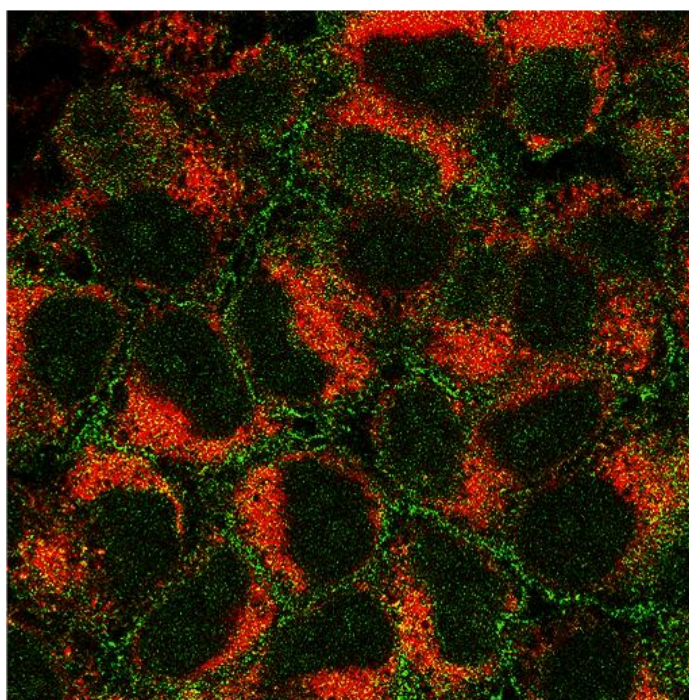
Maxima emisních spekter filipinu a DDHR jsou vůči sobě posunutá asi o 80 nm (emisní maximum filipinu je asi 480 nm, emisní maximum DDHR je asi 560 nm ve vodném prostředí). Obě spektra mají vůči sobě velký překryv. Odlišné spektrální vlastnosti obou sekundárních metabolitů je umožňují od sebe vizuálně odlišit díky různé barvě jejich fluorescence. Emise jednotlivých fluoroforů je však velmi problematické kvantifikovat a odlišit zvláště při využití mikroskopů s černobílou kamerou. Na uvedených obrázcích (Obr. 45) snímaných barevnou CCD kamerou je ukázán rozdíl v barvách emise filipinu a DDHR.





**Obr. 45: Porovnání barvy fluorescence DDHR a filipinu.**

Fixované HeLa buňky a primární kožní fibroblasty byly značeny DDHR nebo filipinem. Snímky byly nasnímány barevnou kamerou. Na obrázku je patrný rozdíl v barvách emise DDHR a filipinu (fluorescenční mikroskop Olympus IX71, objektiv 40x).



**Obr. 46: Dvoubarevné značení HeLa buněk DDHR a filipinem.**

Fluorescence filipinu je znázorněna zeleně, fluorescence DDHR červeně. (konfokální mikroskop Carl Zeiss LSM 780, objektiv 63x).

Díky výše zmíněnému barevnému rozdílu bylo možné tyto makrolidy použít pro dvoubarevné značení buněk a detekovat jejich nezávislou fluorescenci. Makrolid filipin se váže na cholesterol, který je možné pak možné díky fluorescenci filipinu detekovat a kvantifikovat. Z výsledků získaných z fluorescenčních charakteristik DDHR po interakci se steroly, kdy přítomnost sterolů zhasí fluorescenci DDHR, bylo možno usuzovat, že v různých buněčných membránách je možné při komplexní spektrální analýze předpokládat různou intenzitu fluorescenčního signálu filipinu a DDHR. Předpokladem bylo, že filipin označí hlavně membránové struktury obsahující velké množství cholesterolu (plasmatická membrána, trans oblast Golgiho aparátu) a naopak signál DDHR bude možné pozorovat v membránových strukturách chudých na cholesterol (endoplasmatické retikulum, cis a medium oblast Golgiho aparátu).

Fixované buňky byly obarveny jak DDHR, tak filipinem. Z důvodu blízkosti maxim a velkého překryvu emisních spekter obou fluoroforů bylo možné oddělit jejich fluorescenci z dostupných přístrojů pouze na konfokálním mikroskopu Carl Zeiss LSM 780. Skenování preparátu muselo být kvůli vysvěcování obou fluoroforů provedeno velmi rychle, proto bylo rozlišení skenování sníženo. Filipinu byla uměle přiřazena zelená barva, DDHR červená barva.

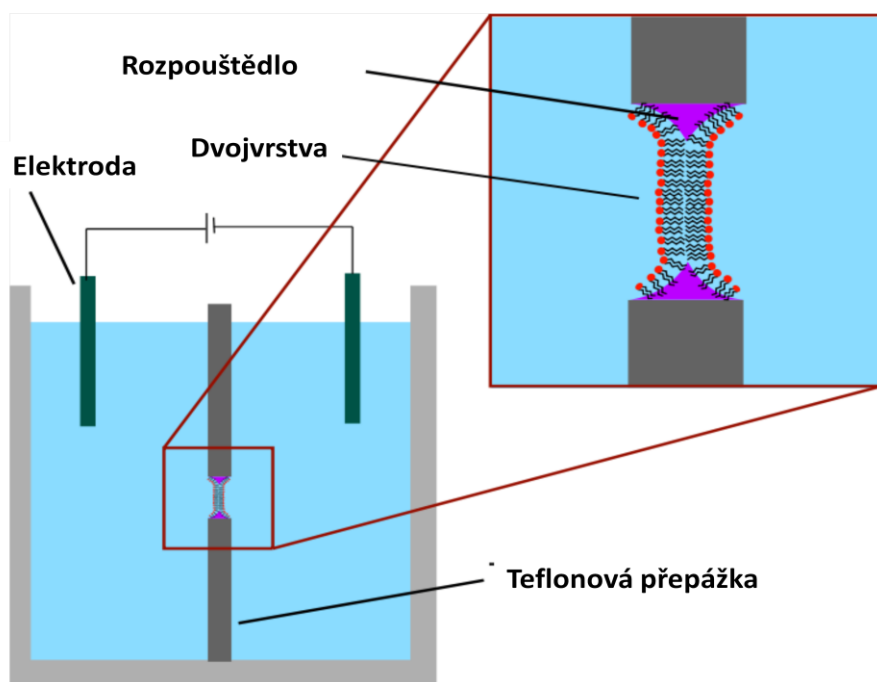
Fluorescence filipinu a DDHR jsou podle předpokladu zřetelně odděleny (Obr. 46). Jasný červený signál DDHR je možné vidět v intracelulárních membránových oblastech chudých na cholesterol, zatímco zelený signál filipinu je přítomen především na plasmatické membráně s vysokým obsahem cholesterolu nebo v její blízkosti. To potvrzuje hypotézu, že fluorescence DDHR je cholesterolem zhasena nebo se DDHR lépe váže do membrán s nižším obsahem cholesterolu.

## 5.6 Interakce DDHR s membránou

V literatuře bylo popsáno několik mechanismů interakce makrolidů s membránou v závislosti na přítomnosti cholesterolu. Některé makrolidy v přítomnosti cholesterolu oligomerizují a tvoří v membráně definované kanály, jiné tuto schopnost nemají a pravděpodobně vstupují do membrán za následného poškození integrity membrány. U některých makrolidů dosud nebyl mechanismus interakce s membránou popsán.

Pro studium interakce DDHR s membránou byly využity černé lipidové membrány, které jsou vhodné pro studium elektrických vlastností membrán.

Černé lipidové membrány jsou jedním z typů experimentálně připravených planárních membrán. Membrána se vytváří v otvoru v teflonové destičce nanesením tenké vrstvy konkrétních fosfolipidů v organických rozpouštědlech přes otvor (průměr v řádech mikrometrů až několika milimetrů) v tenké hydrofobní přepážce mezi komůrkami s elektrolytem. Organická rozpouštědla difundují z lipidové nanášky a membrána se ztenčuje. Kvalitu takto vytvořených membrán lze kontrolovat pomocí bílého světla procházejícího přes otvor s membránou. Silná vícevrstevná membrána odráží při čelním osvětlení barevné reflexe. Při postupném ztenčování lipidové vrstvy začne převládat v otvoru s lipidy barva černá (při 4krát menší tloušťce membrány než je vlnová délka světla). Tento jev je způsoben interferencí odraženého světla z přední strany membrány se světlem odraženým ze zadní strany membrány díky tloušťce membrány, která činí pouze několik nanometrů. Právě odtud pochází název pro takovou membránu – černá lipidová membrána.



**Obr. 47: Schematický náčrt aparatury pro tvorbu černých lipidových membrán.**  
(Upraveno z [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Black\\_lipid\\_membrane.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Black_lipid_membrane.svg)).

Dvě komůrky pro elektrody jsou odděleny lipidovou membránou, tudíž je velmi snadné měřit různé elektrické charakteristiky lipidové dvojvrstvy (Obr. 47). Černé lipidové membrány jsou také ideálním modelem pro studium kanálotvorných molekul zabudovávajících se do membrán. Molekuly mohou tvořit póry v lipidové membráně, kterými prochází ionty elektrolytu, jejichž pohyb je možno zaznamenat jako elektrický proud.

Záměrem experimentů provedených na černých lipidových membránách bylo zjistit, zda DDHR tvoří po interakci s membránou (s možným přidavkem membránového cholesterolu) kanály podobně jako roflamykoin nebo amfotericin B.

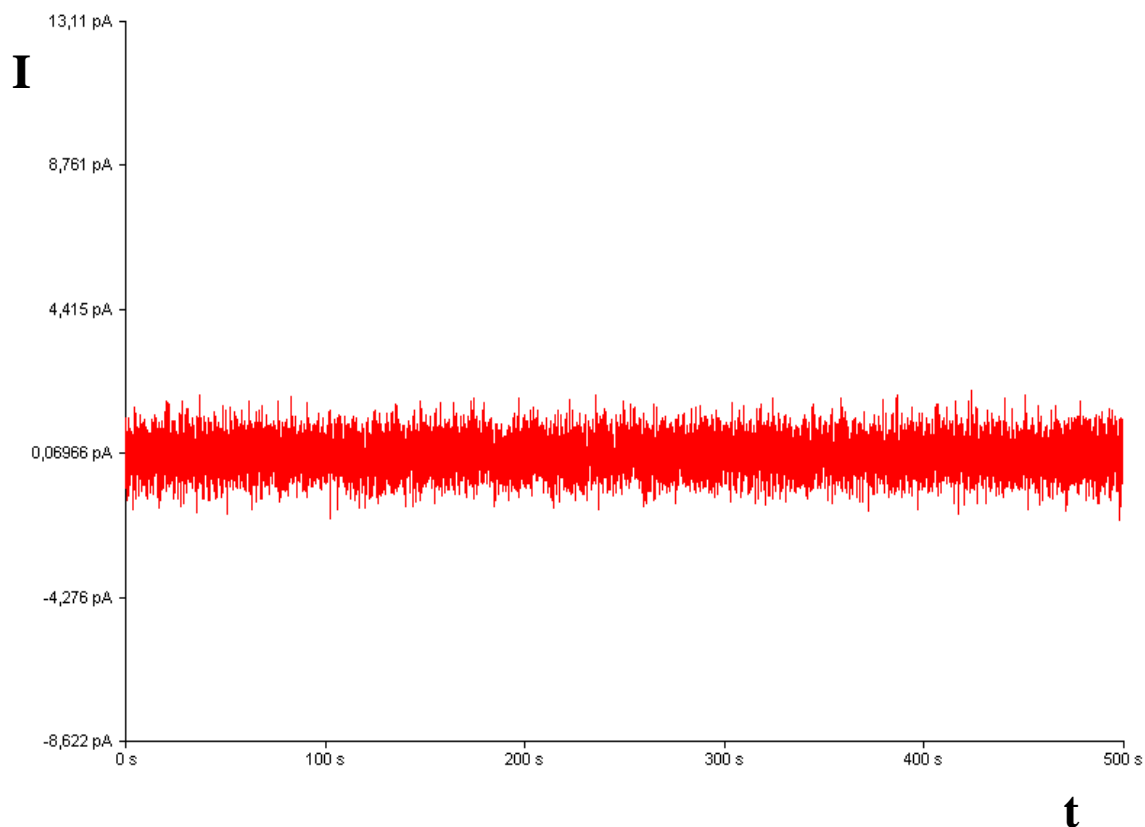
Černé lipidové membrány byly vytvořeny ze sojových azolipidů (s majoritním zastoupením sojového lecitinu). Směs syntetických DPPC/DMPC s cholesterolem i bez cholesterolu, které byly použity pro tvorbu liposomů (oddíl 4.14), se ukázaly být velmi nestabilní a nevhodné pro účely měření charakteristik takto připravených umělých membrán. Připraveny tedy byly azolipidové membrány, které se standardně využívají ke studiu elektrických vlastností molekul vázajících se do membrán, s 30% molárním obsahem cholesterolu a membrány bez cholesterolu (rozpouštědlo dekan:butanol v poměru 9:1). Jako elektrolyt byl použit 1M KCl v 10mM Tris (pH 7,4). Napětí bylo

nastaveno na 72 mV. Pro kontrolu stability a čistoty membrány byly změřeny vodivosti membrán s obsahem cholesterolu (Obr. 48) i bez něj (Obr. 49) bez přídavku DDHR.

Membrány složené pouze z azolipidů s cholesterolem nebo bez něj se ukázaly jako být velmi stabilními strukturami a dobrými izolanty (Obr. 48, Obr. 49).

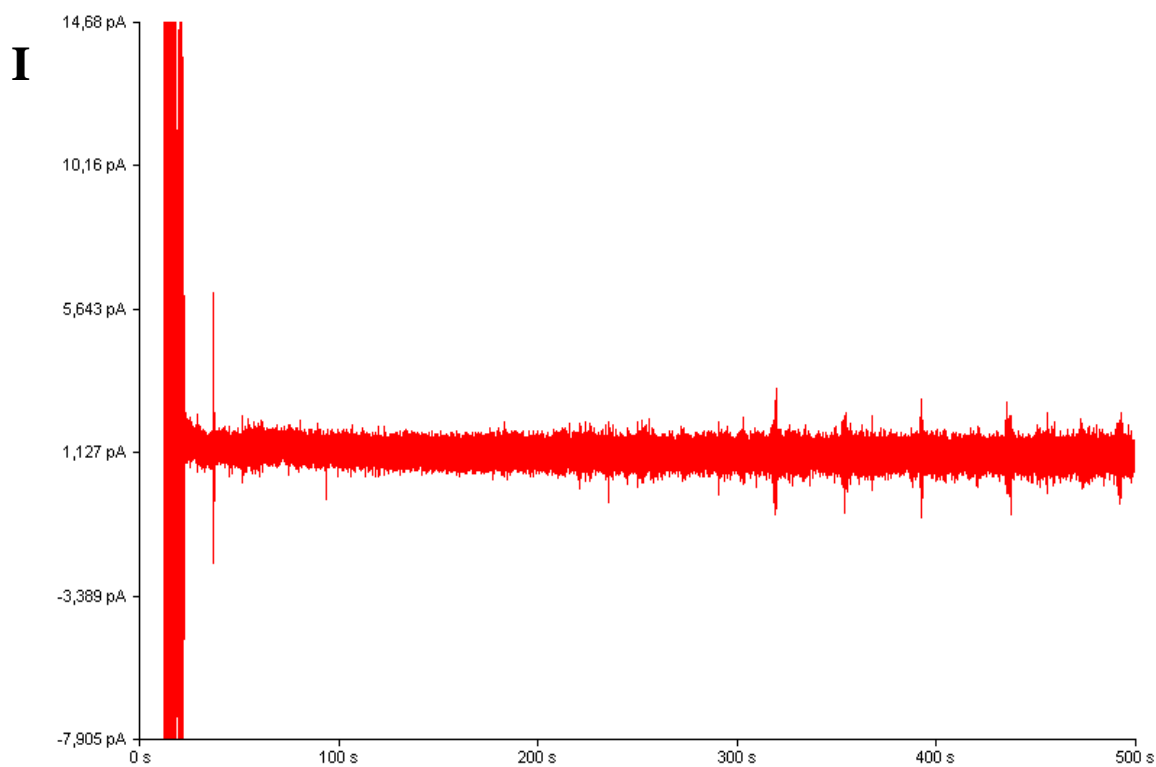
Makrolid DDHR byl přidáván do části kyvety na kladné straně membrány, tedy do komůrky s anodou. Toto prostředí napodobovalo extracelulární buněčný prostor. DDHR byl přidáván postupně na výsledné koncentrace 7 $\mu$ M, 14 $\mu$ M a 21 $\mu$ M. Nejprve bylo provedeno měření membrán bez cholesterolu s DDHR. Poté byla aparatura opláchnuta střídavě destilovanou vodou a ethanolem a opět bylo měření provedeno na membránách s cholesterolem.

Vzhledem k tomu, že DDHR byl k membránám přidáván v zásobním roztoku v DMSO, bylo provedeno i měření vodivosti membrány s přídavkem DMSO odpovídající objemu v nejvyšší koncentraci přidávaného DDHR. Měření stability membrány ukázala, že DMSO v takové koncentraci nemá na vodivost membrán žádný vliv.



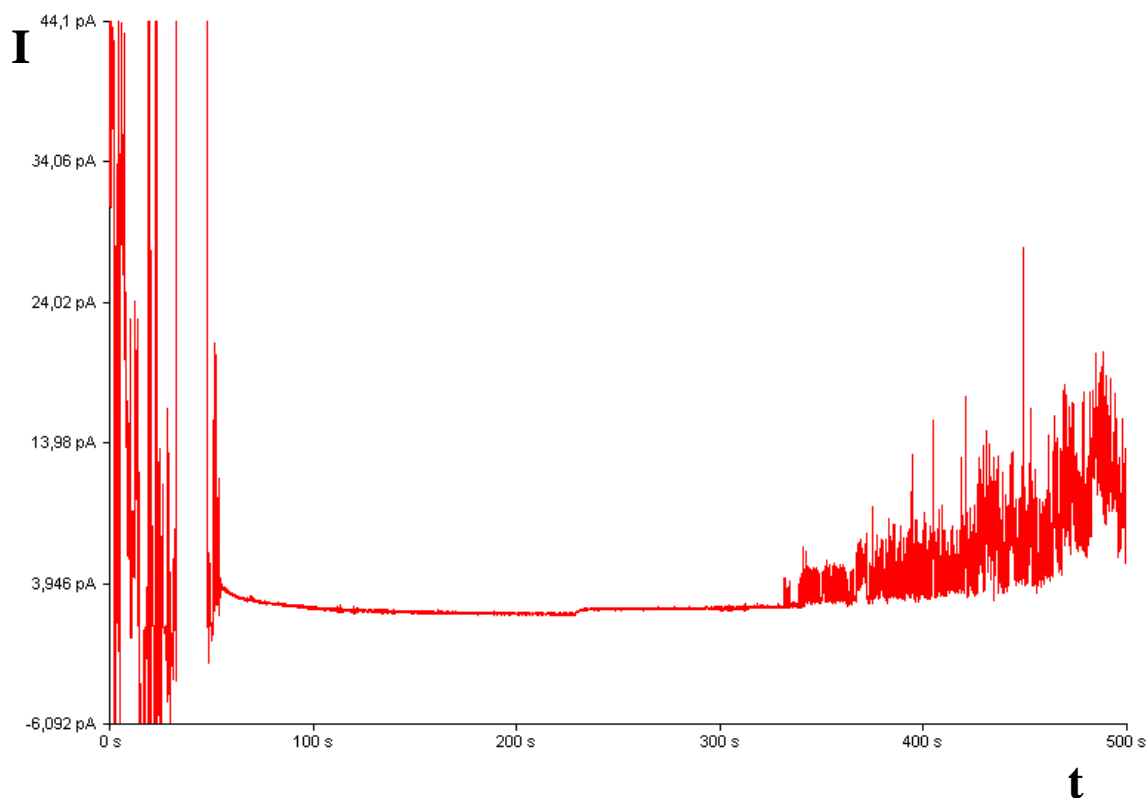
**Obr. 48: Záznam vodivosti azolipidové membrány s cholesterolem.**

Vynesení průběhu vodivosti umělé membrány jako závislosti proudu procházejícího membránou (I) na čase (t).



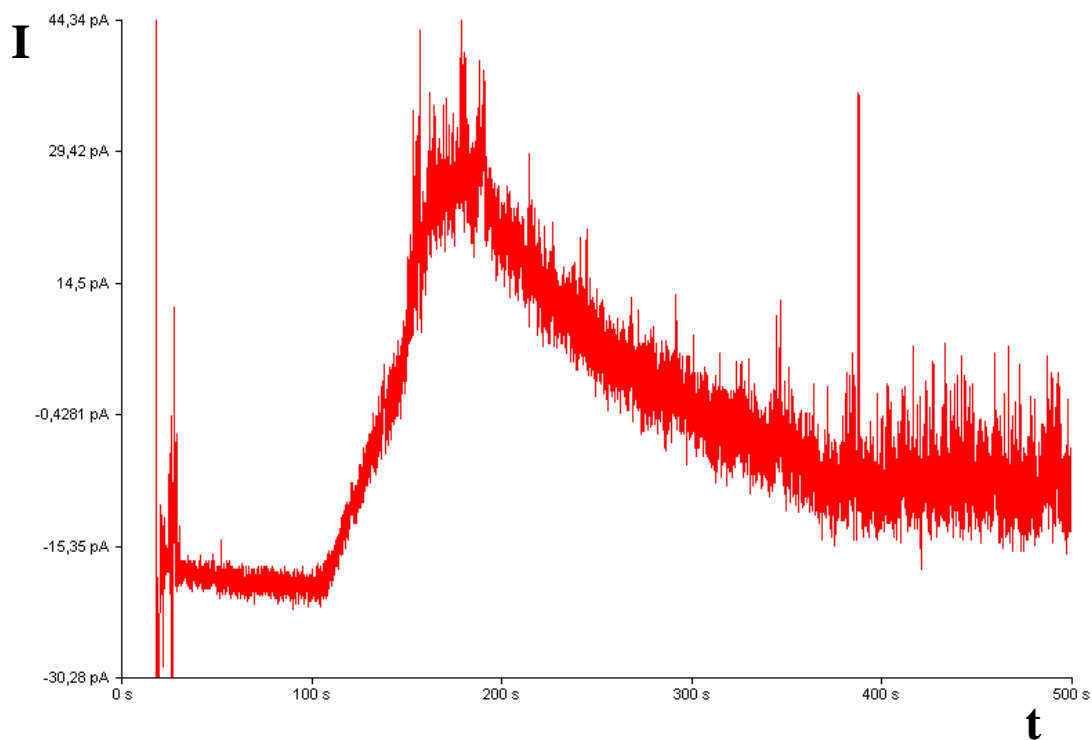
**Obr. 49: Záznam vodivosti azolipidové membrány bez cholesterolu.**

Velký šum na začátku záznamu je způsoben tvorbou membrány. Vynesení průběhu vodivosti umělé membrány jako závislosti proudu procházejícího membránou (I) na čase (t).



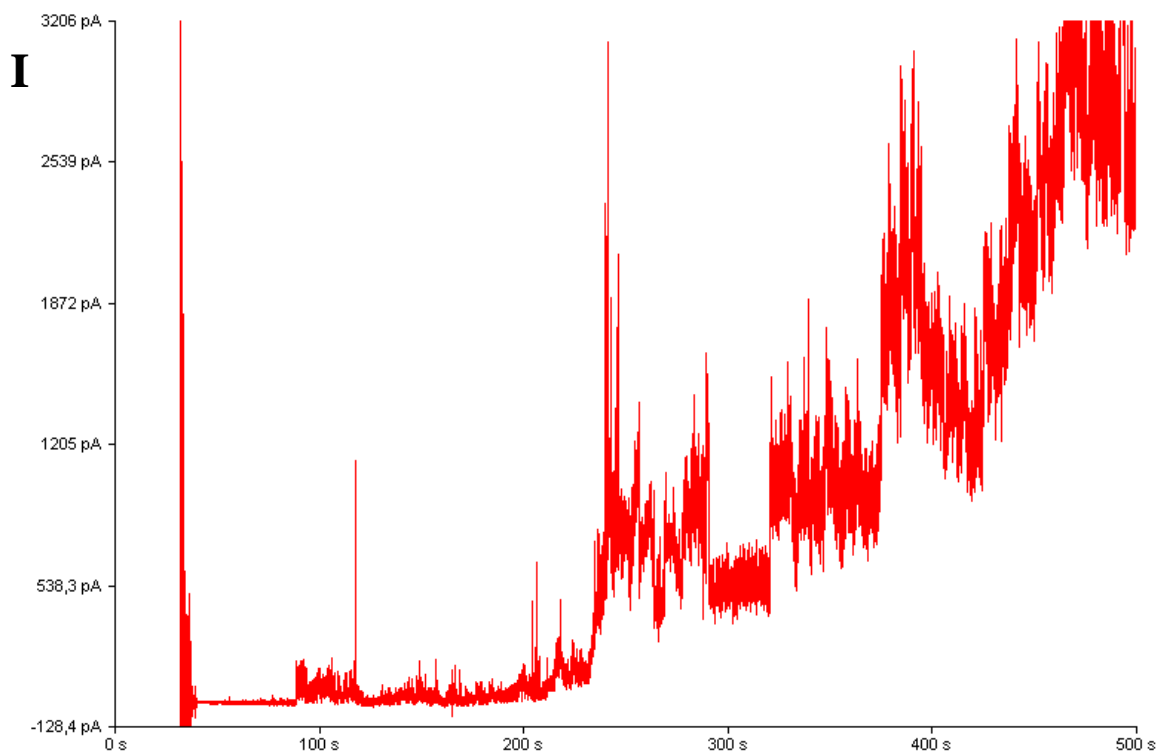
**Obr. 50: Průběh změn vodivosti azolipidové membrány bez cholesterolu s 14 $\mu$ M DDHR.**

Vynesení průběhu vodivosti umělé membrány jako závislosti proudu procházejícího membránou (I) na čase (t).



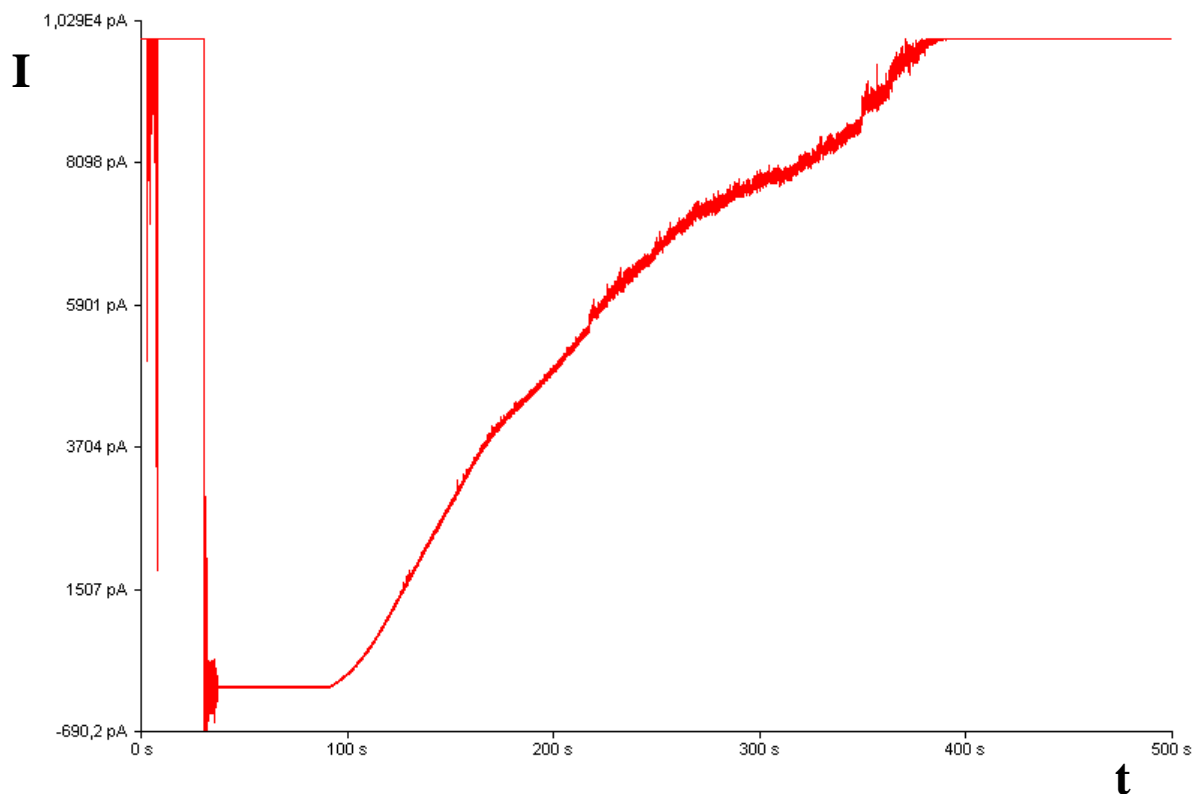
**Obr. 51: Průběh změn vodivosti azolipidové membrány s cholesterolem s 14 $\mu$ M DDHR.**

Vynesení průběhu vodivosti umělé membrány jako závislosti proudu procházejícího membránou (I) na čase (t).



**Obr. 52: Průběh růstu vodivosti azolipidové membrány bez cholesterolu s 21  $\mu$ M DDHR.**

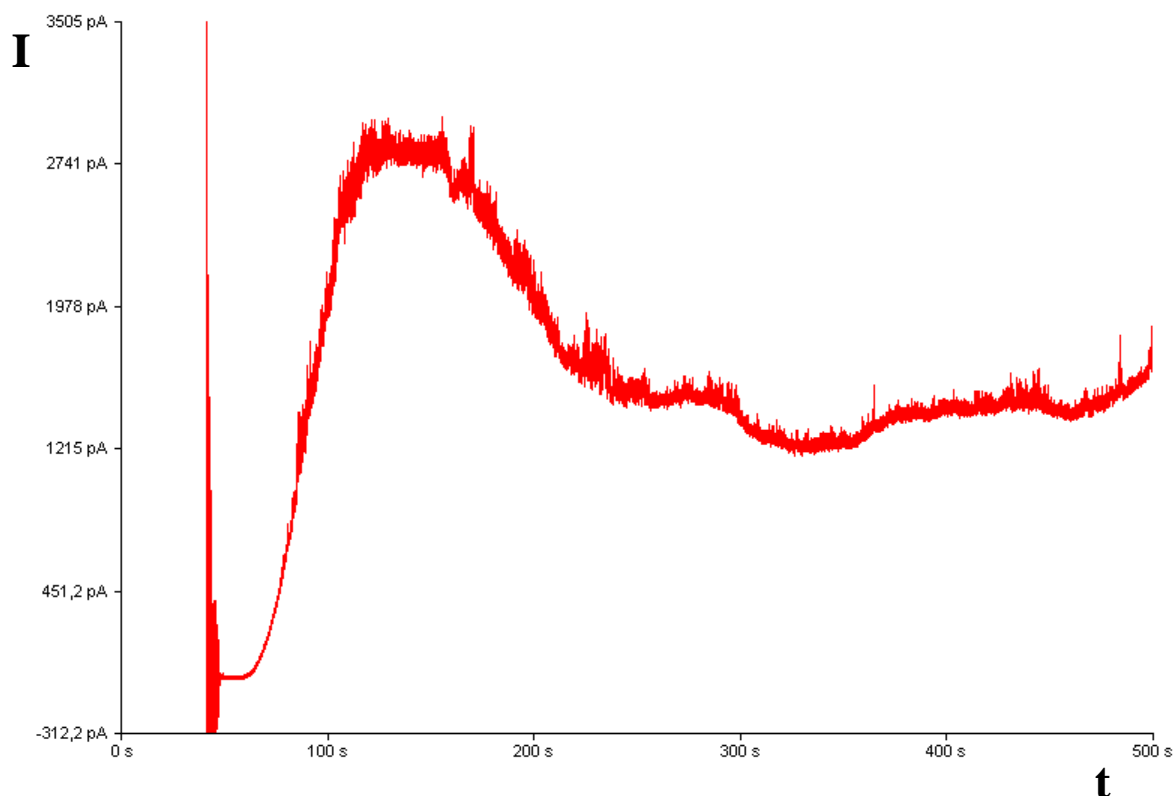
Vynesení průběhu vodivosti umělé membrány jako závislosti proudu procházejícího membránou (I) na čase (t).



**Obr. 53: Průběh růstu vodivosti azolipidové membrány s cholesterolem a 21  $\mu$ M DDHR.**

Vynesení průběhu vodivosti umělé membrány jako závislosti proudu procházejícího membránou (I) na čase (t).





**Obr. 54: Průběh růstu vodivosti azolipidové membrány s cholesterolem a 21  $\mu\text{M}$  DDHR.**

Vynesení průběhu vodivosti umělé membrány jako závislosti proudu procházejícího membránou ( $I$ ) na čase ( $t$ ).

Ačkoliv byla měření pro stejnou koncentraci DDHR vždy 3krát opakována vždy s nově vytvořenou membránou, chování membrán nebylo totožné. Vliv na chování membrány má i její aktuální tloušťka nebo průsvit.

Z naměřených záznamů proudu procházejícího přes membrány lze však zaznamenat určité charakteristické rysy. Azolipidové membrány bez cholesterolu se 7  $\mu\text{M}$  koncentrací DDHR se chovaly velmi homogenně a žádný nárůst vodivosti nebyl zaznamenán. Naměřený průběh vodivosti se velmi podobal čisté membráně bez DDHR (Obr. 49). U „bezcholesterolových“ membrán s 14  $\mu\text{M}$  DDHR byl nárůst vodivosti již znatelný (Obr. 50). Proud vystoupal během deseti minut na 24–97 pA. Růst vodivosti byl zahájen poměrně diskrétními póry s vodivostí okolo 28 pS, které přecházely do velkých fluktuací vodivosti. U bezcholesterolových membrán, k nimž bylo přidáno 21  $\mu\text{M}$  DDHR, se jejich chování podobalo membránám s 14  $\mu\text{M}$  DDHR, avšak s dramatičtějšími fluktuacemi vodivosti (Obr. 52). „Kanály“ naměřené v těchto membránách dosahovaly vodivosti 28–3400 pS.

Membrány obsahující cholesterol vykazovaly odlišné chování oproti membránám bez cholesterolu. Přídavek 7  $\mu$ M DDHR nezpůsobil dramatické změny vodivosti membrán, které se v elektrických vlastnostech chovaly podobně jako membrány bez DDHR (Obr. 48). Žádný významný nárůst vodivosti tedy nebyl zaznamenán. V případě membrány s 14  $\mu$ M DDHR se vodivost po 11–70 s rapidně zvýšila. U membrán, kde byl použit zesilovač napětí 100 GV/A, nebylo možné zaznamenávat vysoké vodivosti, v důsledku toho bylo měření po třech minutách ukončeno. Po výměně zesilovače na 1 GV/A byl zaznamenán po asi 70 s prudký nárůst vodivosti na cca 550 pS, procházející proud vystoupal až k hodnotám okolo 30 pA, poté vodivost postupně klesala, přičemž šum byl značný (Obr. 51). „Kanály“, které se vyskytovaly u membrán bez cholesterolu, se v záznamu nevyskytovaly a to ani na počátku dramatického růstu vodivosti.

Nejvíce odlišné charakteristiky vykazovaly membrány s cholesterolem a 21  $\mu$ M DDHR. Byly naměřeny dva průběhy vodivosti. Růst vodivosti byl buď poměrně rychlý, ale trvalý až na 140 nS a 10 000 pA (dále již kvůli omezenému rozsahu měřitelného proudu nebylo možné nárůst zaznamenat) (Obr. 53), nebo velmi rychlý na hodnoty 41–140 nS a 3000–10 000 pA (Obr. 54). Následně však vodivost rapidně poklesla. Žádné kanály zaznamenány nebyly, nárůst i pokles vodivosti těchto membrán byl velmi plynulý a hladký, s vyšším šumem ve vyšších vodivostech ovšem bez přítomnosti detekovatelné kanálotvorné aktivity.

Vodivosti naměřené při různých koncentracích DDHR v časech 0 min, 3 min a 10 min jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 6). Každá membrána se stejnou koncentrací DDHR byla změřena minimálně 3krát. U membrán, které vykazovaly podobný průběh vodivosti, byly hodnoty zprůměrovány. Hodnoty, které ukazují významně odlišnou vodivost v jednotlivých časech, jsou uvedeny zvlášť. Záporné hodnoty vodivosti nově vytvořených membrán jsou způsobeny použitím zesilovače 1 GV/A, který hodnoty odchyloval asi o 16 pA směrem k záporným hodnotám.

**Membrány bez cholesterolu**

	Procházející proud [pA]		
	0. minuta	3. minuta	10. minuta
0μM DDHR	0,9	0,9	0,8
7μM DDHR	0,6	1,1	1,1
14μM DDHR	2,5	2,1	24,3
	2,7	5,7	97
21μM DDHR	-16	-15	55
	-15	85,5	6337

**Tab. 6: Hodnoty vodivosti umělých membrán bez cholesterolu a různou koncentrací DDHR na počátku měření v 0. minutě, ve 3. a 10. minutě.**

Pomocí programu QuB byly analyzovány křivky průběhu vodivosti membrán ve výše uvedených časech. od tvorby membrány.

**Membrány s cholesterolem**

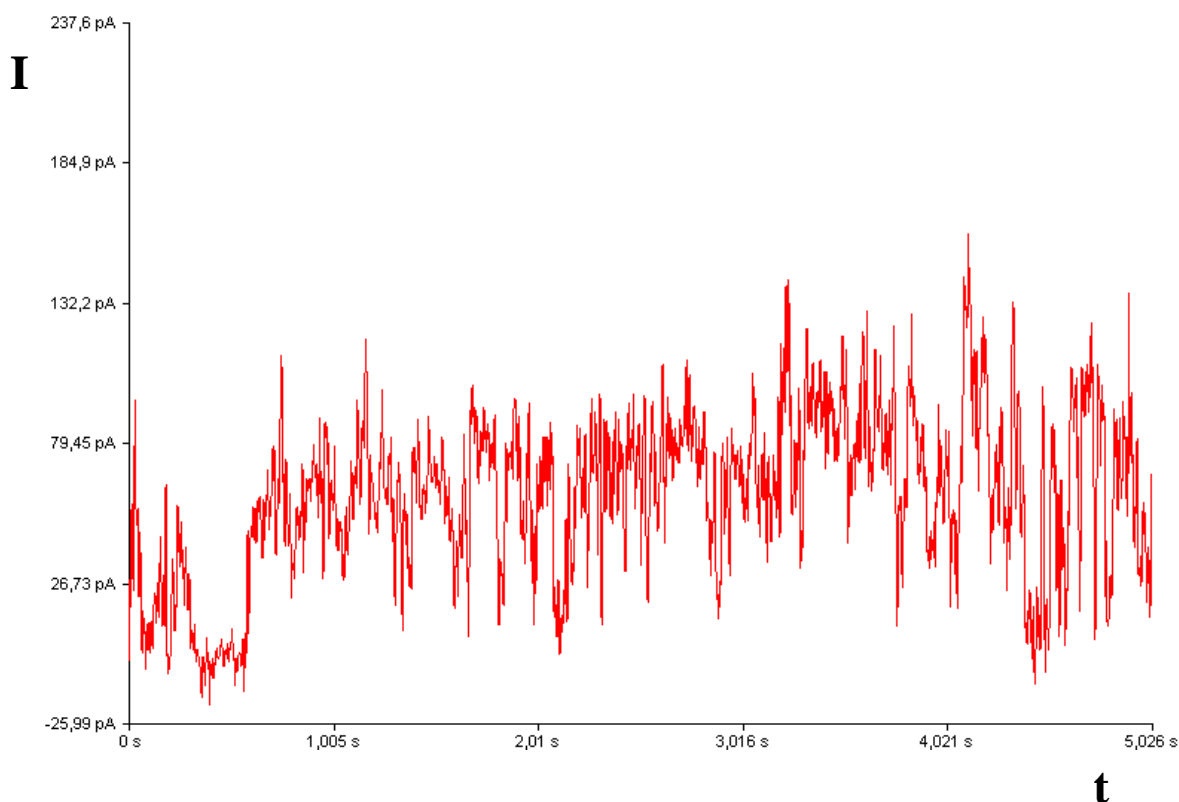
	Procházející proud [pA]		
	0. minuta	3. minuta	10. minuta
0μM DDHR	1,6	1,2	1,1
7μM DDHR	1,7	1,4	1,3
14μM DDHR	4	100	
	-17	18	3,5
21μM DDHR	-14	9227	479
	-16	1279	3117
	-16	5239	9981

**Tab. 7: Hodnoty vodivosti umělých membrán s cholesterolem a různou koncentrací DDHR na počátku měření v 0. minutě, ve 3. a 10. minutě.**

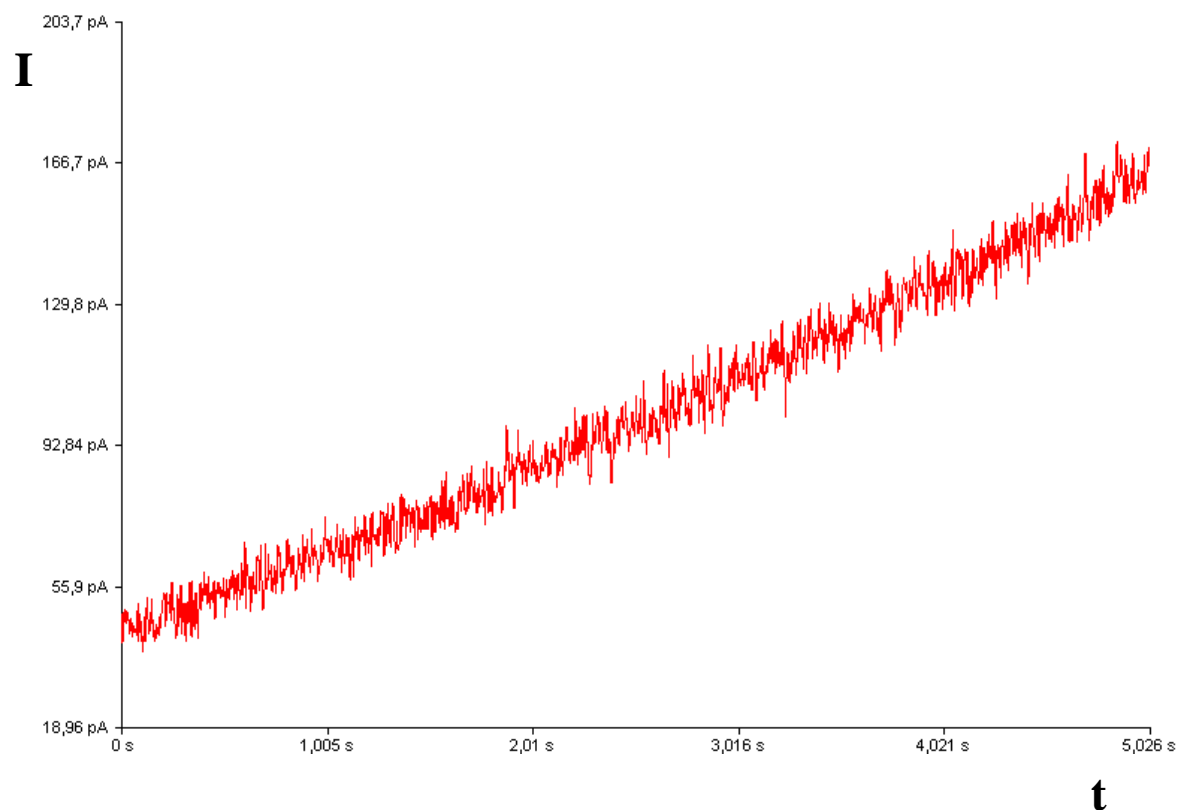
Pomocí programu QuB byly analyzovány křivky průběhu vodivosti membrán ve výše uvedených časech od tvorby membrány.

Rozdílné hodnoty vodivosti membrán stejného složení se stejnou koncentrací DDHR pro výše uvedené časy jsou důsledkem tvorby membrány mezi komůrkami o různém průsvitu. Je téměř nemožné v aparatuře, v níž bylo toto měření prováděno, vytvořit dvě totožné membrány. U dvojvrstev s větším průměrem je možné naměřit vyšší vodivost v důsledku možné přítomnosti většího množství pórů pro průchod iontů.

Vodivost membrán bez cholesterolu a s cholesterolem se po přidavku DDHR nelišila pouze svým celkovým průběhem, ale i charakterem zaznamenávaného signálu. Na obrázku (Obr. 55) je záznam fluktuace vodivosti v interavu 5 s v membráně bez cholesterolu. Na obrázku (Obr. 56) pak postupný nárůst vodivosti v cholesterolové membráně během stejného časového úseku.



**Obr. 55: Záznam vodivosti azolipidové membrány bez cholesterolu s  $21\mu\text{M}$  DDHR ve 100.-105. sekundě od vytvoření membrány. Vynesení průběhu vodivosti umělé membrány jako závislosti proudu procházejícího membránou (I) na čase (t).**



**Obr. 56: Záznam vodivosti azolipidové membrány s cholesterolem a  $21\mu\text{M}$  DDHR ve 100.–105. sekundě od vytvoření membrány. Vynesení průběhu vodivosti umělé membrány jako závislosti proudu procházejícího membránou (I) na čase (t).**

Charakter záznamu vodivosti se velmi lišil u membrán bez cholesterolu i s cholesterolem. Ukázkou odlišností ve vodivosti je detailní vynesení zaznamenaného průběhu průchodu proudu membránou bez cholesterolu a 21 $\mu$ M DDHR (Obr. 55) a membránou s cholesterolem a 21 $\mu$ M DDHR (Obr. 56) ve 100. sekundě od tvorby membrány. Při detailnějším studiu záznamů obou typů membrán v různém čase od tvorby membrány nebyl ani v jednom případě zaznamenán vznik homogenních kanálů typických pro molekuly tvořící v membráně definované póry nebo kanály.

Obecně lze říci, že membrány vykazovaly i při vysokých vodivostech dobrou stabilitu, prakticky žádná z membrán nebyla v přítomnosti DDHR v rámci měřeného časového rozsahu poškozena do takové míry, aby byla degradována. Zdá se, že DDHR reaguje na přítomnost membránového cholesterolu tvorbou mnoha velmi malých pórů, zatímco u membrán bez cholesterolu tvoří nedefinované poruchy jejich integrity.

## 5.7 Přímá detekce interakce DDHR s cholesterolem

Z předchozích výsledků je možné usoudit, že DDHR by se mohl vázat na cholesterol. Jednalo se však vždy o nepřímá pozorování (pokles intenzity fluorescence v přítomnosti cholesterolu, odlišný průběh nárůstu vodivosti umělých membrán s cholesterolem). K potvrzení této hypotézy bylo využito dalších fyzikálních metod – nukleární magnetické rezonance a infračervené spektroskopie.

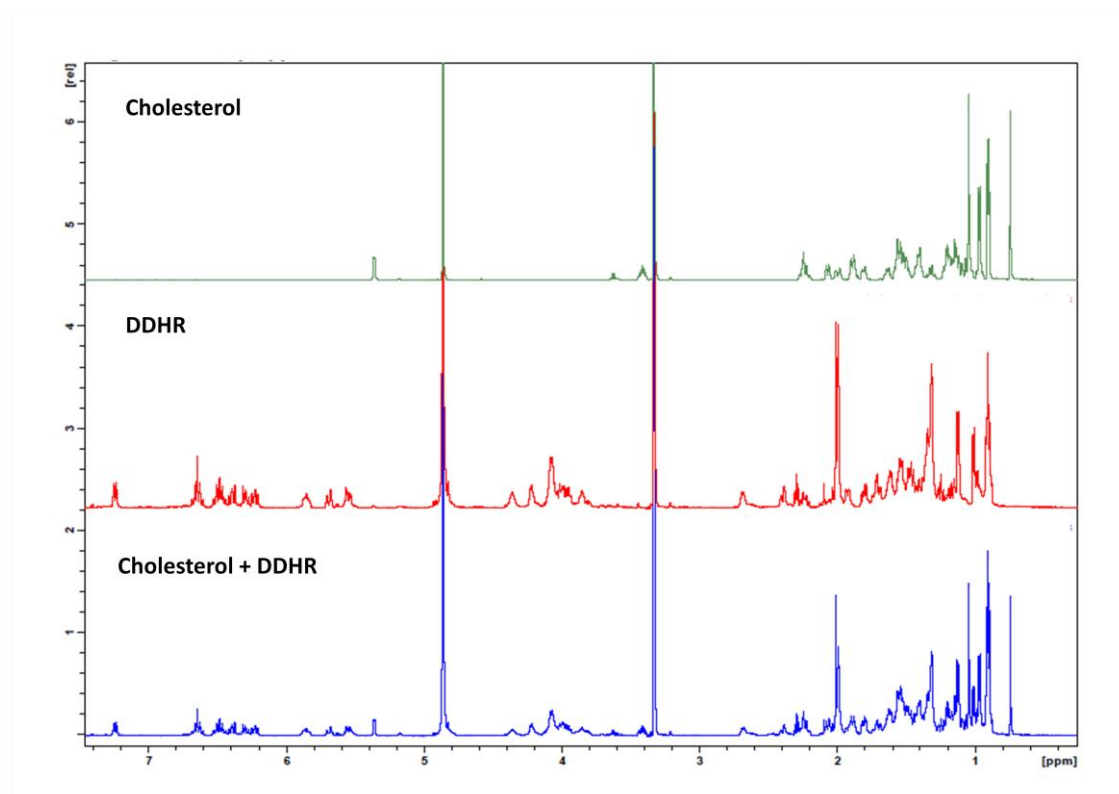
### 5.7.1 Nukleární magnetická rezonance

Pro přímý důkaz interakce DDHR s cholesterolem byla využita nukleární magnetická rezonance.

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je široce využívanou metodou pro studium struktury molekul a jejich interakcí. NMR sleduje chování atomových jader s nenulovým spinem a s tím spojeným magnetickým momentem v silném magnetickém poli po radiofrekvenčním pulsu. Nejčastěji se detekuje jádro izotopu vodíku  $^1\text{H}$ . To se v molekulách s obsahem vodíku vyskytuje ve 100% zastoupení a dává také nejsilnější

odezvu. Úspěšnost NMR spektroskopie je založena na schopnosti odlišit od sebe jednotlivá jádra zapojená v různých chemických strukturách a sledovat jejich spojení do chemických vazeb díky různým stínícím efektům elektronů v molekule. Vedle základní chemické struktury však NMR umožňuje určovat také prostorovou strukturu, čehož se hojně využívá ve strukturní biologii například při studiu proteinů. Dále NMR umožňuje studovat pohyblivost molekul, jejich flexibilitu, vznik komplexů a interakcí s jinými molekulami.

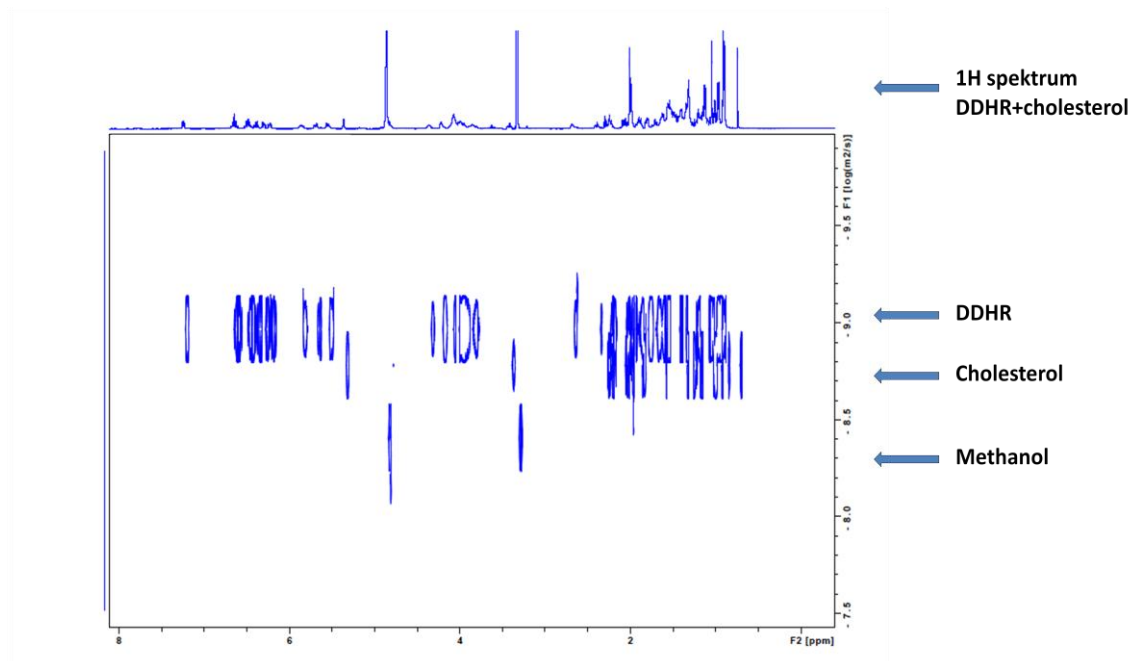
Pro analýzu interakce mezi DDHR a cholesterolem bylo zvoleno polární rozpouštědlo deuterovaný methanol, ve kterém se rozpouští jak cholesterol, tak DDHR. Nejdříve bylo změřeno spektrum samotného DDHR, poté spektrum samotného cholesterolu. Nakonec byly obě látky smíchány a naměřeno spektrum obou látek v rozpouštědle.



Obr. 57:  $^1\text{H}$  NMR spektra cholesterolu, DDHR a směsi cholesterolu s DDHR v methanolu.

Na vodíkových spektrech DDHR, cholesterolu a směsi DDHR s cholesterolem (molární poměr 1:1) rozpuštěném v methanolu je možné vidět, že spektrum cholesterol + DDHR je prostým součtem signálů z obou látek měřených samostatně (Obr. 57). Z toho je možné vyvodit, že obě látky spolu v methanolu nejspíše neinteragují, protože interakce by se projevila posunem některých pásů spekter. Silný signál v 3,31 ppm a 4,78 ppm

pochází z methanolu, který není stoprocentně deuterovaný. Pro potvrzení výše uvedeného výsledku bylo změřeno i 2D DOSY (Diffusion ordered spectroscopy) spektrum, které poskytuje informaci o translační difuzi molekul (Obr. 58).



**Obr. 58: 2D-DOSY spektrum pro cholesterol, DDHR a směsi cholesterolu s DDHR v methanolu.**

Pokud by DDHR s cholesterolem interagoval za vzniku stabilního komplexu, difuzní koeficient pro obě látky by byl stejný, protože by difundovaly jako celek. V případě slabší interakce by difuzní koeficienty byly alespoň částečně ovlivněny zpomaleny. DDHR a cholesterol mají ve směsi odlišné difuzní koeficienty (Obr. 58) a ani při podrobnějším vyhodnocení nebyly zjištěny významné odchylky od vlastností naměřených na samostatných roztocích.

Pomocí NMR spektroskopie bylo tedy zjištěno, že v methanolu makrolid DDHR s cholesterolem neinteraguje.

## 5.7.2 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Data získaná z NMR spektroskopie nepotvrdila interakci DDHR s cholesterolem v polárním prostředí methanolu. Předpokladem tedy poté bylo, že k interakci DDHR s cholesterolem by mohlo docházet pouze v membránovém prostředí. Bylo tedy nutné hledat jiný způsob, jakým by bylo možné interakci DDHR s cholesterolem potvrdit. Jako vhodné interakční prostředí by mohly být SDS micely, které by měly napodobovat prostředí reálných membrán. Ke studiu interakce DDHR s cholesterolem v SDS micelách jsme využili infračervenou spektroskopii. Tato metoda na rozdíl od NMR nevyžaduje použití deuterovaného SDS a je jednodušší pro naměření a vyhodnocení dat.

Infračervená spektroskopie je analytická metoda určená pro strukturní charakterizaci organických i anorganických látek, založená na studiu vibračních energetických přechodů v molekule prostřednictvím absorpce infračerveného záření. Infračerveným zářením se rozumí rozsah vlnových délek  $12800\text{--}10\text{ cm}^{-1}$ . Nejčastěji měření probíhá v tzv. střední infračervené oblasti  $4000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$ . Infračervené záření nemá dostatečnou energii na změnu elektronových stavů, po absorpci molekulou se mění pouze rotační/vibrační stav. Ke změně vibračního stavů dochází pouze za současné změny dipólového momentu, absorpce záření je důsledkem interakce s oscilujícím dipólem.

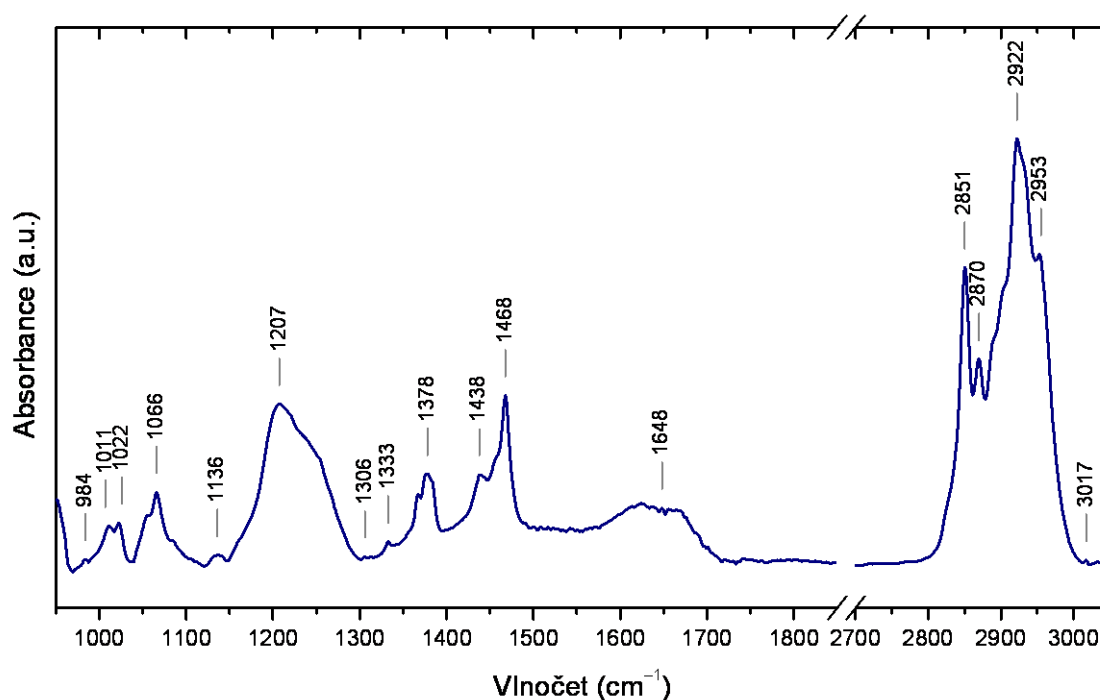
Výstupem infračervené analýzy je pásové infračervené spektrum vynesené do grafu jako závislost transmitance nebo absorbance infračerveného záření na vlnové délce dopadajícího záření. Jednotlivé pásy odpovídají jednotlivým typům změn vibračních stavů. V oblasti  $4000\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$  (oblast skupinových vibrací) se nachází signál funkčních skupin molekuly. Oblast  $1000\text{--}200\text{ cm}^{-1}$  se nazývá oblast „otisku palce“ (fingerprint), kde jsou zaznamenány převážně deformační vibrace, které jsou ovlivněny samotnou strukturou molekuly. Po interakci dvou molekul se změní vibrační vlastnosti molekul, což je možné pozorovat na výsledném infračerveném (IR) spektru jako posun některých vrcholů ve spektru interagujících molekul vůči IR spektrům naměřeným na samotných molekulách.

Měření interakce DDHR s cholesterolem v SDS bylo nejprve provedeno pomocí techniky ATR (attenuated total reflectance) FTIR s diamantovým ATR hranolem ATR MIRacleTMAG – horizontal single reflection. Z důvodu slabého

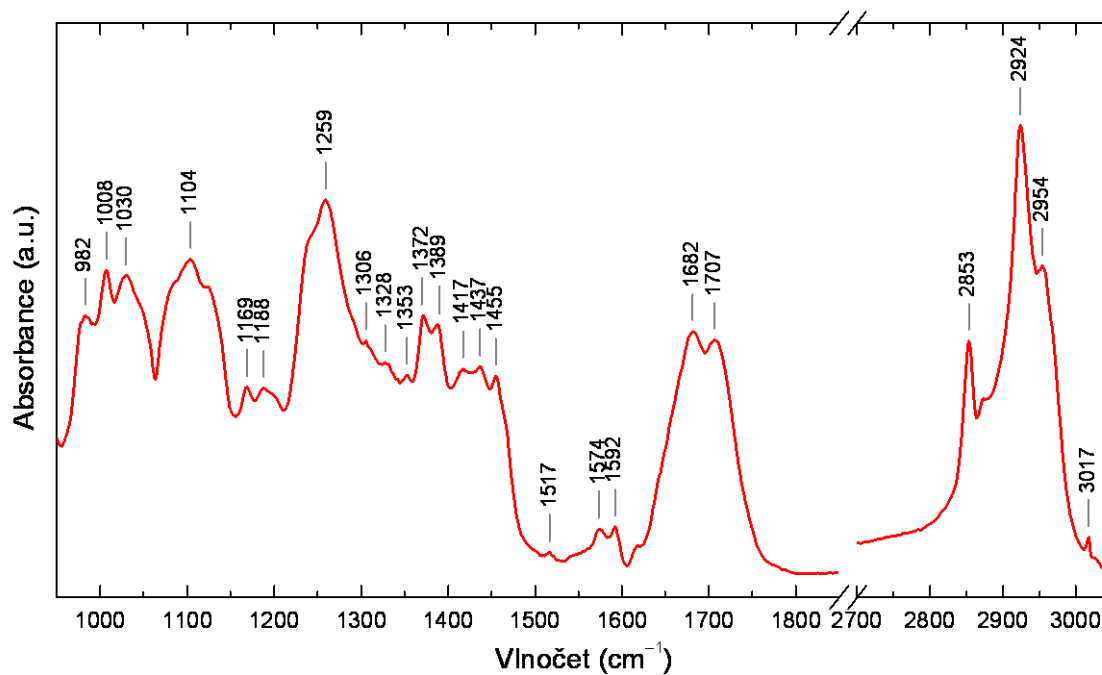


výstupního signálu bylo přistoupeno k měření absorbance infračerveného záření v  $8\mu\text{m}$   $\text{CaF}_2$  kyvetě. U vzorků s cholesterolem nebylo podle přítomného zákalu jisté, kolik cholesterolu se v SDS skutečně rozpustilo. Výsledná koncentrace cholesterolu v micelách SDS je tedy nejistá. Z důvodu přítomnosti zákalu ve vzorcích s cholesterolem byly vzorky před každým měřením důkladně protřepány.

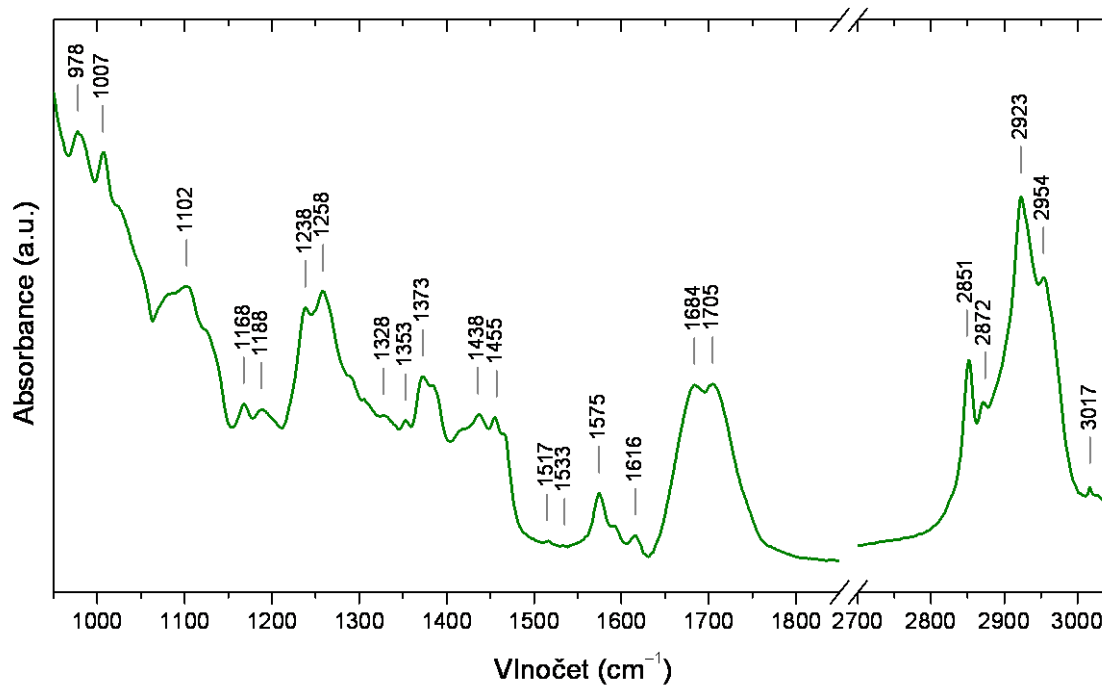
Změřená FT-IR spektra jednotlivých roztoků byla zpracována odečtením spektra samotného rozpouštědla, tedy 80mM SDS ve vodě. Odečet byl proveden na pás vody ve  $2150\text{ cm}^{-1}$  (Dousseau et al., 1989). Následně byla naměřená spektra korigována na spektra vodních par.



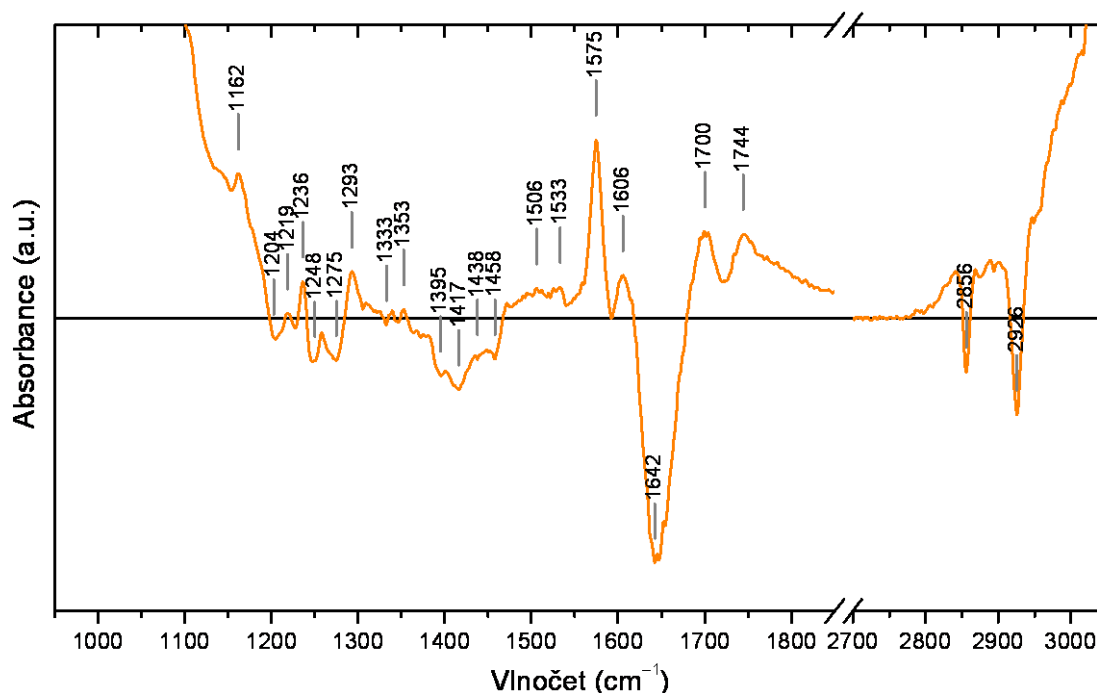
Obr. 59: Infračervené spektrum 40mM cholesterolu v 80mM SDS.



Obr. 60: Infračervené spektrum 40mM DDHR v 80mM SDS.



Obr. 61: Infračervené spektrum směsi 40mM DDHR a 40mM cholesterolu v 80mM SDS.



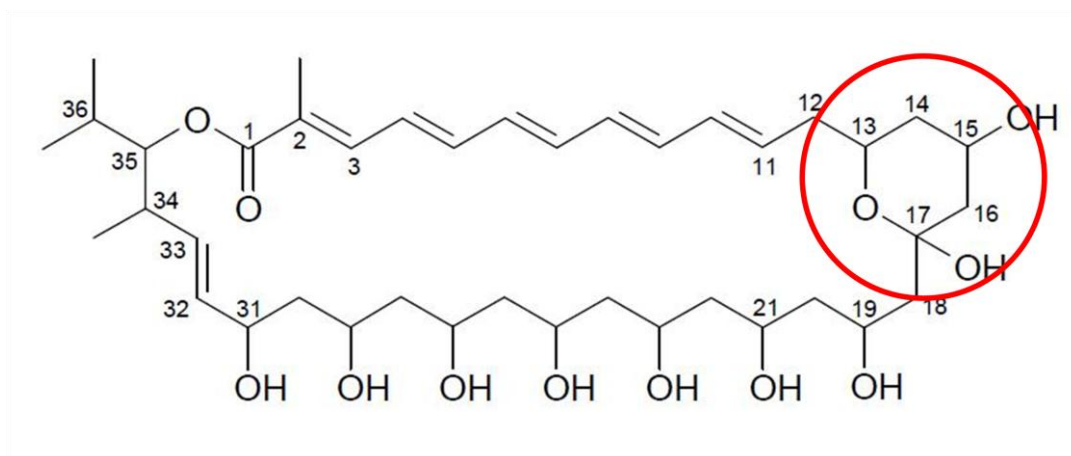
**Obr. 62:** Diferenční spektrum získané odečtením spektra volného 40mM DDHR a volného 40mM cholesterolu od směsi 40mM cholesterolu a 40mM DDHR v 80mM SDS.

Pro detekci případné vazby DDHR s cholesterolem v přítomnosti 80 mM SDS byl odečten signál volného DDHR (Obr. 60) a následně volného cholesterolu (Obr. 59) od spektra směsného vzorku (Obr. 61), čímž bylo získáno diferenční spektrum (Obr. 62). Pozorované diferenční pásy odpovídají změně vibrací molekul díky vzájemné interakci DDHR a cholesterolu. Vzhledem k tomu, že FT-IR spektrum cholesterolu nemá žádné výrazné pásy v oblasti od asi  $1500\text{ cm}^{-1}$  do  $2800\text{ cm}^{-1}$ , všechny pozorované změny vibrací (v diferenčním spektru) v této oblasti odpovídají změnám v molekule DDHR.

Pro několik pásů ve spektru DDHR v SDS (Obr. 60) se podařilo identifikovat atomy nebo funkční skupiny, které k nim náležejí. Pás na  $1707\text{ cm}^{-1}$  odpovídá C=O valenčním vibracím, jeho rozšíření u asi  $1682\text{ cm}^{-1}$  je pravděpodobně dáno C=C vazbou. Oblast kolem  $1574\text{ cm}^{-1}$  by pravděpodobně měla odpovídat valenčním vibracím šestičlenného uhlíkatého heterocyklu přítomného v molekule DDHR. Při provnání diferencí těchto vibrací (Obr. 62) se zdá, že velmi silně jsou vazbou cholesterolu ovlivněny vibrace na  $1642\text{ cm}^{-1}$  (odpovídající nejspíše konjugovaným C=C vazbám) a na  $1575\text{ cm}^{-1}$  (odpovídající nejspíše vibracím C–C vibracím šestičlenného kruhu), zatímco jen malá

změna je pozorována u vibrací C=O na  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Z toho lze usuzovat, že molekula cholesterolu se váže v blízkosti šestičlenného heterocyklu a interaguje se systémem konjugovaných C=C vazeb v řetězci. Tato vazba nejspíše ovlivňuje i karbonylové vibrace na opačném konci molekuly DDHR. V oblasti pod  $1500\text{ cm}^{-1}$  nelze jednoznačně odlišit změnu vibrací v molekule cholesterolu od DDHR.

Pomocí FT-IR byla prokázána vazba mezi DDHR a cholesterolem v prostředí 80mM SDS. Cholesterol se pravděpodobně váže na DDHR v oblasti uhlíků C13–C17 (Obr. 63).



**Obr. 63: Označení místa interakce DDHR s cholesterolem.**

## 6 Diskuze

Studium makrolidů izolovaných z mikroorganismů je potenciálně velmi zajímavé z hlediska jejich možného využití jako antibiotik použitelných v medicíně nebo jako fluorescenčních sond, jak je tomu v případě filipinu. Detailní charakteristika takové nadějně látky je bránou k jejímu dalšímu aplikačnímu využití.

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat nový polyenový makrolid, který byl izolován z nově popsaného druhu aktinomycet *Streptomyces durmitorensis*, a to z hlediska fluorescenčních vlastností, bioaktivity a mechanismu interakce s membránou. Na začátku jsem pomocí molekulárně-biologických metod ověřila identitu bakteriálního druhu. Sekvenací části genu SSU rDNA jsem ukázala, že námi kultivované bakterie náleží skutečně k druhu *Streptomyces durmitorensis*. Z důvodu vysoké homologie této sekvence u druhů příbuzných se *Streptomyces durmitorensis* jej nebylo možné provedenou sekvenací jasně odlišit od druhů *Streptomyces kanamyceticus* a *Streptomyces aureus*. Vzhledem k tomu, že jsme bakterie obdrželi z laboratoře RNDr. Miroslava Fliegra, CSc. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, kde se *Streptomyces kanamyceticus* nekultivuje, není kontaminace tímto druhem téměř možná. *Streptomyces aureus* se zde kultivuje v jiné laboratoři, avšak na tak špičkovém pracovišti, jakým Mikrobiologický ústav bezpochyby je, je taková kontaminace téměř vyloučena. Je tedy možné téměř s jistotou říct, že získané bakterie náleží opravdu k druhu *Streptomyces durmitorensis* a nejedná se o kontaminaci nebo nechtěnou záměnu.

### 6.1 Fluorescenční charakteristiky

Izolovaný metabolit DDHR se ukázal jako molekula se zajímavými fluorescenčními vlastnostmi. Jeho fluorescence je zřetelně odlišitelná od autofluorescence buněk.

Polarita prostředí nemá vliv na posun spektra DDHR (pouze ve vodném prostředí se projevuje posun emisního maxima asi o 10 nm směrem k červené oblasti), má ale vliv na intenzitu fluorescence. Ve vodném prostředí je intenzita fluorescence DDHR

poměrně nízká oproti více nepolárním rozpouštědlům, kdy intenzity dosahují až 14násobku intenzity ve vodě. Tento jev je dán zřejmě tím, že DDHR je ve vodě poměrně málo rozpustný a tvoří zde agregáty, v nichž nejspíše dochází k samozhášení. Navíc, při opakovaném měření fluorescence DDHR se ve vodném prostředí velmi rychle mění tvar excitačního spektra i intenzita fluorescence DDHR a to i po protřepání. Tento jev včetně snížení intenzity fluorescence je typický právě pro některé látky, které tvoří agregáty (např. Fischer, 1996). Ze struktury DDHR je možné usuzovat, že molekuly budou mít tendenci ve vodném prostředí agregovat prostřednictvím hydrofobních částí molekuly s konjugovanými vazbami a tím zvýšit svůj celkový hydrofilní potenciál. V nepolárnějších rozpouštědlech pak tato tendence slábne.

V prostředí s nižší dielektrickou konstantou, jako je ethanol, benzen nebo chloroform, je intenzita fluorescence ve srovnání s vodným prostředím vysoká a stabilní, podobný je i tvar excitačního a emisního spektra. Intenzita emise je například v chloroformu 5,5krát vyšší než ve vodě, v benzenu dokonce až 14krát vyšší. Existují však také látky, u kterých se intenzita fluorescence zvyšuje mnohonásobně více po vstupu z vody do nepolárního prostředí - například difenylhexatrien (Kitagawa et al., 1991), ale i molekuly, kde rozdíl intenzit jejich fluorescence v závislosti na polaritě prostředí není tak velký (Vincent et al., 2005). Důvodů pro změnu intenzity fluorescence DDHR v různých rozpouštědlech může být více (změna extinkčního koeficientu způsobenou změnou tvaru molekuly v různém prostředí, nevhodně zvolená excitační vlnová délka pro konkrétní rozpouštědlo atd.). Tyto faktory zatím nebyly proměřeny.

Ve velmi nepolárních rozpouštědlech, jako je dekan nebo hexan, je rozpustnost téměř nulová. Ve vodě je možné DDHR kvantitativně rozpustit tak, že výše zmíněné pravděpodobné agregáty nejsou znatelné pouhým okem, jedná se tedy spíše o mikroskopické agregáty. Naopak v případě dekanu nebo hexanu je možné agregáty DDHR okem pozorovat. U těchto rozpouštědel jsou tedy naměřená spektra diskutabilní, a proto nejsou v této práci uvedena.

Posun spektra závislý na pH je možné pozorovat například u fluoresceinu nebo CFDA-SE, což jsou fluorofory, které se díky svému posunu emisního spektra přímo využívají k detekci pH. U DDHR nemá pH vliv na posun fluorescenčního spektra k červeným nebo modrým oblastem. V zásaditém pH však u DDHR k určitým změnám dochází. V  $\text{pH} > 8$  je možné zaznamenat snížení maxima emisního spektra a naopak nárůst emise v krátkovlnných oblastech. Tento jev je možné vysvětlit buď tvorbou

agregátů v zásaditém prostředí a díky nedokonalostem spektrofleurometru se díky rozptylům zdánlivě zvyšuje intenzita fluorescence DDHR v modré oblasti, nebo má fluorescenční spektrum dvě složky, u kterých se mění jejich poměr v závislosti na změně pH. Pro správnou interpretaci tohoto jevu by bylo vhodné použít excitační filtr, který eliminuje chyby monochromátoru nebo excitovat fluorofofor krátkým pulsem a měřit zpoždění odezvy, která by v případě fluorescence měla být delší než v případě prostého rozptylu od agregátů.

Během našich experimentů bylo také zjištěno, že závislost intenzity fluorescence DDHR na jeho koncentraci v prostředí pufru TBS není lineární. Předpoklad, že by tento jev mohl být způsoben přítomností vnitřního filtru, nebyl potvrzen jak vizuální kontrolou, tak i měřením ředící řady pomocí spektrofleurometru. V ostatních rozpouštědlech tento koncentrační experiment proveden nebyl. Jak bylo již diskutováno výše, DDHR pravděpodobně tvoří agregáty ve vodném prostředí. Zvyšování intenzity fluorescence nelineárně v závislosti na koncentraci DDHR jen potvrzuje výše zmíněný předpoklad.

V literatuře je možné nalézt experimentální data, která poukazují na schopnost některých makrolidů s podobnou strukturou jako DDHR interagovat se steroly (např. Bolard, 1986, Lopes et al., 2004, Gray et al., 2012). Jednou z takových molekul je filipin, komerčně dostupná sonda pro fluorescenční vizualizaci cholesterolu. Předpokládali jsme tedy, že DDHR může mít podobné chování. Měření intenzit fluorescence DDHR v přítomnosti liposomů s přesně definovaným lipidovým složením ukázalo jasný rozdíl v intenzitě fluorescence DDHR vázaného do liposomů obsahujících steroly (cholesterol, ergosterol) ve srovnání s liposomy bez sterolů, v nichž mělo DDHR intenzitu fluorescence mnohem větší. Intenzita fluorescence DDHR v liposomech s ergosterolem byla nižší než intenzita jeho fluorescence v liposomech s cholesterolem. Vzhledem k tomu, že všechny vzorky obsahovaly stejnou koncentraci DDHR jsou nasnadě dvě vysvětlení. Buď se DDHR do liposomů se steroly váže méně ochotně a větší část zůstává ve vodném prostředí, kde je jeho intenzita fluorescence slabší než v méně polárním prostředí lipidové membrány, a tím se snižuje naměřená intenzita jeho fluorescence nebo DDHR vstupuje do membrán liposomů a je zhasen interakcemi se steroly, přičemž ergosterol zhasí fluorescenci DDHR efektivněji než cholesterol. Druhé vysvětlení je i vzhledem k výsledkům naměřeným na černých lipidových membránách, kde DDHR prokazatelně vstupoval do membrán

s cholesterolem, pravděpodobnější. Prokázané interakce některých strukturně podobných makrolidů se steroly také podporují druhé vysvětlení (Gray et al., 2012). V takovém případě by bylo vhodné naměřit i dobu života fluorescence DDHR pro zjištění, o jaký typ interakce se jedná (tvorba stabilních komplexů nebo prostá srážka se sterolem).

Měření na buňkách, tedy na živém systému s komplexním složením membrán, potvrdilo výsledky získané z předchozích měření fluorescence DDHR v rozpouštědlech i na liposomech. Spektrum DDHR měřené pouze v HBSS bylo z hlediska intenzity fluorescence i tvaru emisního spektra srovnatelné se spektrem DDHR ve vodě. Po přidání buněk se však intenzita fluorescence DDHR zvýšila přibližně 4krát. Dielektrická konstanta membrán má hodnotu 2–10, což přibližně odpovídá dielektrické konstantě chloroformu, případně benzenu. V případě chloroformu byla naměřena intenzita fluorescence asi 5,5krát vyšší než ve vodě. V reálných buněčných membránách se však nachází i molekuly cholesterolu, které by podle výsledků získaných měření fluorescence DDHR na liposomech měly fluorescenci DDHR snižovat. Vzhledem k tomu, že není jasná stechiometrie interakce molekul DDHR a cholesterolu a zároveň i počet molekul DDHR vázaných do buněčných membrán, je možné, že ke zhášení cholesterolem skutečně dochází, avšak díky převaze počtu molekul DDHR nad cholesterolem není celkový pokles intenzity fluorescence tak velký. To by přibližně odpovídalo i tomu, že v chloroformu, tedy rozpouštědlo podobnému membránám, kde není přítomen cholesterol, proto je v něm intenzita fluorescence DDHR vyšší než v případě buněčných membrán s cholesterolem.

V rámci charakterizace fluorescenčních vlastností DDHR jsem proměřila kinetiku vysvěcování fluoroforu na fixovaných buňkách zalitých v Mowiolu, na fixovaných buňkách v Mowiolu v přítomnosti kyseliny askorbové jako antioxidačního činidla a přímo v myceliu bakterií *Streptomyces durmitorensis* (také zalitým v Mowiolu) pomocí opakovaného skenování vzorků na konfokálním mikroskopu. Ukázalo se, že fluorofor přítomný v myceliu vykazuje o mnoho nižší kinetiku vysvěcování. To může být způsobeno tím, že v myceliu mohou být přítomny látky stabilizující produkovaný makrolid, svou roli však může hrát i obsah cholesterolu, který v bakteriálních buňkách na rozdíl od savčích buněk není přítomen. Vzrůst intenzity fluorescence na počátku měření u buněk zalitých v Mowiolu s kyselinou askorbovou nedokážeme ani po poradě s odborníky vysvětlit.



Z fluorescenčních analýz DDHR jsme tedy zjistili, že nejspíše tvoří ve vodném prostředí agregáty, v nepolárním prostředí se intenzita jeho fluorescence zvyšuje, je však snižována přítomností cholesterolu. Polarita prostředí nemá výrazný vliv na posun emisního maxima, výrazně se však mění spektra excitační. Hodnota pH vodného prostředí nemá vliv na posun emisního maxima DDHR, pozorovali jsme však změny tvaru emisního spektra v zásaditém prostředí. Studium fluorescenčních charakteristik DDHR přineslo několik zajímavých zjištění a velké množství otázek. V budoucnu by bylo vhodné podrobit fluorescenční charakteristiky DDHR podrobnějšímu zkoumání.

## 6.2 Bioaktivita

Spektrofotometrickým měřením nárůstu mikrobiální biomasy pomocí růstových křivek jsem zjistila toxický efekt DDHR na kvasinkový kmen *Saccharomyces cerevisiae* kmene EGY48. Zpomalení růstu se projevuje již v 5  $\mu$ M koncentraci DDHR, v 10  $\mu$ M koncentraci je již inhibice nárůstu biomasy více než zřejmá. Pro bakteriální kmen *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$  jsem v měřených koncentracích nezjistila žádný toxický efekt. Porovnáním filipinu s DDHR je jasné, že filipin je pro kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmene EGY48 mnohem toxičtější, na růst bakterií nemá podobně jako DDHR žádný vliv. V korelaci s výsledky, které poukazují na interakci DDHR s cholesterolem, se zdá, že toxicita DDHR je závislá na přítomnosti ergosterolu nebo cholesterolu v membráně, které bakteriální membrány neobsahují. Takový mechanismus toxického působení makrolidů na kvasinky obsahující ergosterol byl již prokázán (Gray et al., 2012). Je možné, že toxická dávka DDHR pro bakterie se může pohybovat nad měřenými koncentracemi. Pravděpodobné však je, že filipin ani DDHR neinteragují s hopanoidy obsaženými v membránách bakterií. Měření s vyššími koncentracemi DDHR jsem v tomto případě zatím neprovedla. V rozporu s těmito výsledky je však studie Savic et al. (2007), v níž je uvedeno, že producent DDHR (*Streptomyces durmitorensis*) nevykazuje antimikrobiální aktivitu vůči *Saccharomyces cerevisiae* FAS20, což je kmen pro naše účely porovnatelný s kmenem EGY48. Toxický je pro kvasinky kmen *Saccharomyces cerevisiae* FAV20, který byl cíleně vyvinut pro zvýšení senzitivity k imunosupresivu FK506 (Skoko et al., 2005). Podle informací z osobní komunikace s RNDr. Stodůlkovou také izolovaný metabolit DDHR

vykazuje podobnou toxicitu na *Saccharomyces cerevisiae* kmene FAS20 a FAV20 jako celé bakterie *Streptomyces durmitorensis* použité v publikaci Savic et al. (2007).

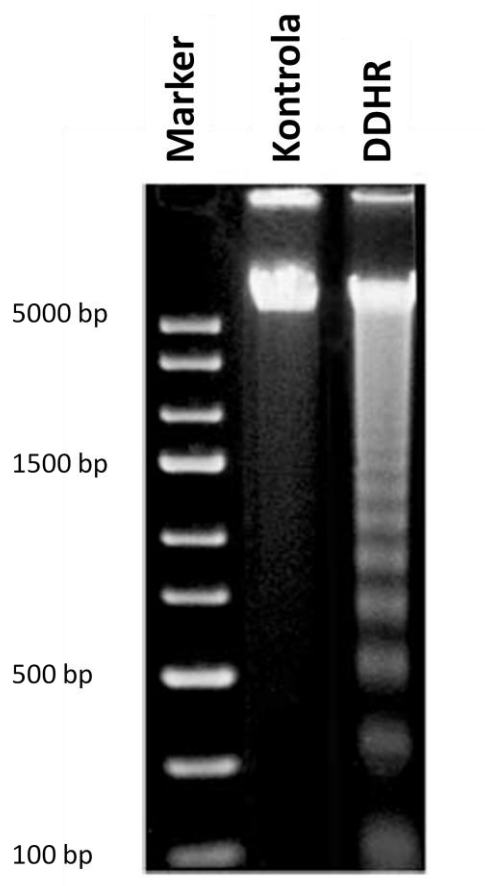
DDHR má prokazatelný toxický vliv i na lidské buňky. To jsem přímo prokázala experimentem zjišťujícím viabilitu lidských buněk v tkáňových kulturách po přidání DDHR. Toxická koncentrace DDHR pro buňky linie Jurkat se nachází v rozmezí 12–25  $\mu\text{M}$ . Toto koncentrační rozmezí se potvrdilo i při sledování změn buněčného cytoskeletu HeLa buněk po inkubaci buněk s DDHR. U 25  $\mu\text{M}$  koncentrace je F-aktin vizualizovaný pomocí značeného faloidinu již prakticky nezatelný, mikrotubuly se uspořádávají do shluků. DDHR pravděpodobně nemá přímý vliv na buněčný cytoskelet, ale spíše na membránové struktury, které poškodí, což může vést právě ke změnám na cytoskeletu. V porovnání s makrolidem filipinem se zdá, že DDHR je pro buňky méně toxický. U filipinu byl zaznamenán toxický vliv již v 1  $\mu\text{M}$  koncentraci, kdy byla patrná depolymerace tubulinu, v 10  $\mu\text{M}$  koncentraci již polymerovaný aktin i tubulin prakticky vymizel. Nižší toxicita DDHR oproti filipinu by mohla být výhodou při vývoji nové fluorescenční sondy pro použití na živých buňkách. Komerčně dostupný filipin je možné aplikovat vzhledem k jeho toxicitě v podstatě pouze na fixované buňky.

Mé výsledky získané ovlivňováním buněk DDHR a následná analýza cytoskeletálního buněčného systému přímo nekorespondují s výsledky, které získali autoři publikace Stodůlková et al. (2011). V této publikaci je uvedeno, že po ovlivnění buněk 10  $\mu\text{M}$  DDHR po dobu 24 h dochází k úplné ztrátě F-aktinu. V mé práci je uvedena inkubace buněk s DDHR 2 h, kdy i při 12  $\mu\text{M}$  koncentraci DDHR je F-aktin stále přítomný. Podobná morfologie cytoskeletálního systému buněk, tedy přítomnost F-aktinu i při 12  $\mu\text{M}$  koncentraci DDHR, však byla pozorována i u 24 h inkubace.

Při porovnání výsledků vlivu DDHR na cytoskeletální systém u HeLa buněk (oddíl 5.4.3) a obrázků získaných z mikroskopie těchto buněk po barvení kitem LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit (oddíl 5.4.2.3) se 12  $\mu\text{M}$  koncentrace jeví jako ještě netoxická pro buňky značené LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit a toxická pro buňky, které byly podrobeny analýze cytoskeletálního systému. Cytoskeletální systém je však daleko citlivější na změny, které se v celkové morfologii buněk projeví později. Navíc zde může hrát roli i celková denzita buněk. V případě použití kitu LIVE/DEAD<sup>®</sup> Viability/Cytotoxicity Kit byla denzita buněk v kultivační nádobě vyšší než při studiu cytoskeletálního systému. Buňky narostlé v konfluentní vrstvě mohou být odolnější vůči působení toxinů díky „vzájemné podpoře“ například prostřednictvím mnoha

mezibuněčných spojů. Vliv může mít i charakter média. Studium cytoskeletárního systému HeLa buněk bylo provedeno inkubací buněk s DDHR v bezsérovém médiu, inkubace buněk s DDHR a následné značení kitem LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit bylo provedeno v médiu se sérem, což může změnit efektivní koncentraci DDHR pro buňky.

Ve studii Stodůlková et al. (2011) byla zjištěna apoptóza identifikací typického „apoptotického žebříčku“ na agarózové elektroforéze u lidských buněk myeloidní leukocytární linie HL60 (inkubace 4 hodiny s 50 $\mu$ M DDHR) (Obr. 64).



**Obr. 64:** „Apoptotický žebříček“ u buněk HL60 ovlivněných DDHR.

Kontrola = kontrolní buňky neovlivněné DDHR, DDHR = buňky ovlivněné DDHR - délka inkubace 4 h, 50 $\mu$ M DDHR, DNA marker – GeneRuler Express DNA Ladder (upraveno podle Stodůlková et al., 2011).

Přestože jsem provedla řadu experimentů, které se snažily indukci apoptózy makrolidem DDHR potvrdit, nepodařilo se mi tento výsledek zopakovat. Průtoková cytometrie ani analýzy DNA pomocí agarózové elektroforézy nukleových kyselin buněčné linie Jurkat (T-buněčná suspenzní linie náležející podobně jako HL60 mezi leukocyty), inkubovaných s DDHR v různých koncentracích a intervalech inkubace

nepřinesly žádné známky indukce apoptózy. Naopak se jasně ukázalo, že DDHR od asi 12–25  $\mu$ M koncentrace (podle typu buněk) způsobuje přímo nekrózu. Při porovnání FACS diagramů buněk ovlivněných cykloheximidem a TRAIL (proteinem, který vazbou na TRAIL receptor indukuje buněčnou apoptózu) s FACS diagramy naměřenými na buňkách, které jsme inkubovali s DDHR a značili Annexinem-V a DAPI, je zřejmé, že v případě DDHR nastává u většiny buněk v závislosti na koncentraci DDHR přímo nekróza. Z výsledků měření na průtokovém cytometru je možné pozorovat, že populace buněk inkubovaných s 12  $\mu$ M koncentrací DDHR vypadají výrazně jinak než populace inkubované s vyšší koncentrací DDHR. U buněk inkubovaných s 12  $\mu$ M DDHR Annexin-V pozitivní populace není téměř detekovatelná na rozdíl od buněk inkubovaných s vyšší koncentrací DDHR, kde Annexin-V pozitivní populace je jednoznačně přítomná. Vysvětlují si to tak, že u buněk nedochází k apoptóze a tedy k expozici fosfatidylserinu na povrchu buňky, ale vyšší koncentrace DDHR pravděpodobně poškodí membránu takovým způsobem, že Annexin-V vstoupí do buňky a naváže se na fosfatidylserin z vnitřní strany membrány. 12  $\mu$ M koncentrace DDHR naopak nepoškodí membránu do takové míry, aby byl Annexin-V schopný vstoupit do vnitřního prostoru buněk, ale DAPI, což je molekula mnohonásobně menší než protein Annexin-V, může proniknout i méně rozsáhlým narušením integrity membrány. Zřejmě proto jsou buňky inkubované s 12  $\mu$ M DDHR pozitivní pro DAPI a negativní pro Annexin-V. Z uvedených FACS diagramů se zdá, že délka vystavení buněk vlivu DDHR (1,5 h až 6 h) nehraje podstatnou roli v míře toxicity DDHR. Toto zjištění do jisté míry podporují i výsledky experimentů zjišťující vliv DDHR na cytoskeletální systém, kdy se morfologie F-aktinu a mikrotubulů příliš nelišila u vystavení buněk DDHR na 2 h nebo 24 h.

Ani analýzy nukleových kyselin nepřinesly žádné důkazy o indukci apoptózy. I přes vícečetné opakování tohoto experimentu jsem ani jednou v gelu nepozorovala žádný typický „apoptotický žebříček“. Byl však opakovaně pozorován signál nukleových kyselin o velikosti 1000–3000 bp a méně než 200 bp. V tomto případě se jednalo nejspíše o stabilní RNA (rRNA a tRNA), nestabilní mRNA byla pravděpodobně z velké části degradována. U neovlivněných buněk a u buněk s 12  $\mu$ M koncentrací DDHR bylo možné detekovat přítomnost nukleových kyselin v celém rozsahu velikostí. Velká část genomové DNA zůstala po elektroforéze v jamkách u všech vzorků s DDHR. DDHR tedy zřejmě nemá vliv na degradaci genomové DNA související s projevem programované buněčné smrti.

Histogramy intenzity fluorescence z průtokové cytometrie ukázaly, že DDHR skladované 2 roky v - 20 °C ve formě prášku má v kanálu pro detekci sondy Cascade Yellow, která je spektrálně nejvíce podobná DDHR, vyšší intenzitu fluorescence než čerstvě izolované DDHR. Jedním z možných vysvětlení je, že působením „nového“ DDHR se buňky více rozpadají a naměřená intenzita fluorescence může být na buněčných fragmentech celkově nižší než v případě použití „starého“ DDHR. Jiným vysvětlením by mohl být spektrální posun „starého“ DDHR blíže fluorescenčním spektrům sondy Cascade Yellow, na kterou jsou nastaveny filtry v průtokovém cytometru, a tím zachycení silnějšího signálu DDHR prostřednictvím tohoto fluorescenčního kanálu. Nejpravděpodobnější vysvětlení ale zřejmě je, že „staré“ DDHR bylo izolováno z jiného mycelia, kde může být obsah aktivní fluorescenční látky jiný než u „nového“ DDHR.

## 6.3 Fluorescenční značení buněk metabolitem DDHR

Kolokalizační studie měly přinést odpověď na otázku, do jakých membránových struktur se DDHR váže. Některé makrolidy se váží selektivně do různých vnitrobuněčných membránových organel. Filipin značí hlavně membrány bohaté na cholesterol (některé endozomy, plasmatickou membránu), některé synteticky připravené, ale podobné makrolidy se naopak váží do endoplasmatického retikula a mitochondrií (Cruz et al., 2011). Provedla jsem kolokalizační studie na dvou buněčných typech (epitelové adenokarcinomální linii a primárních kožních fibroblastů) s markery pro mitochondrie, lysozomy a časné endozomy, které ukázaly, že DDHR kolokalizuje především s LysoTrackerem a LAMP-1 (markery lysozomů) u HeLa buněk. U fibroblastů fluorescence DDHR kolokalizovala spíše jen s LysoTrackerem, kolokalizace s LAMP-1 je diskutabilní. Je možné, že u fibroblastů obsahují lysozomy pozitivní pro LAMP-1 velké množství cholesterolu (který je z komplexu s LDL nebo HDL v lysozomech uvolňován), což by mohlo vést ke snížení fluorescenčního signálu DDHR.

U ostatních membránových organel (mitochondrie, časné endozomy) jsem kolokalizace nezjistila. Tranferin a EEA1 jsou markery pro časné endozomy, přičemž jejich

subpopulace je pokryta klatrinovými triskeliony. Jedním z možných vysvětlení, proč DDHR neznačí časné endozomy, by mohla být specifická selekce určitých typů lipidů do klatrinem obalených váčků (Johannes & Mayor, 2010). Výsledné lipidové složení takto vzniklých časných endozomálních váčků nemusí být pro vazbu DDHR (případně jeho fluorescenci) vhodné. Tyto struktury také často obsahují velké množství cholesterolu, který by také mohl fluorescenci DDHR potlačovat. Interakci s DDHR by také mohla bránit přítomnost klatrinových molekul na povrchu těchto typů endozomů. Někteří autoři v *in vitro* experimentech zjistili, že k podobnému jevu dochází u filipinu. Přítomnost klatrinového obalu brání vazbě filipinu, po disociaci klatrinového obalu od endozomu se již filipin na endozomy váže (Steer et al., 1984).

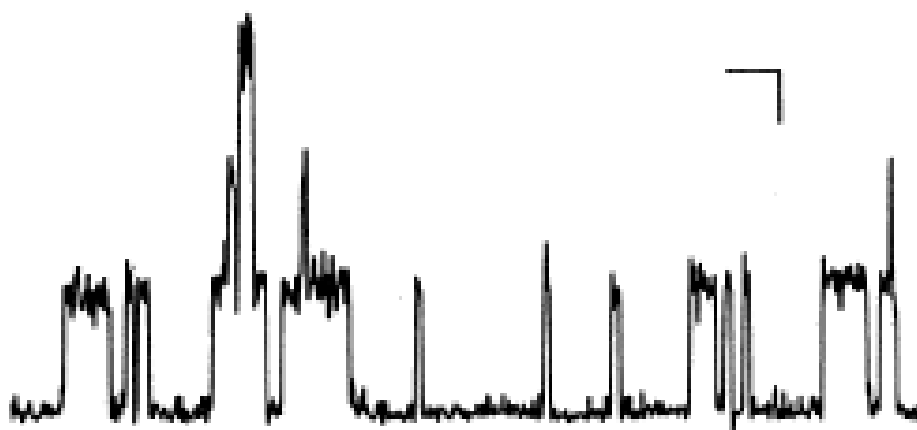
Dle výsledků z kolokalizačních studií jsme předpokládali, že by se DDHR měl vázat i na anomální lysozomy v buňkách z pacientů s některými lysozomálně střídavými chorobami, jako jsou Gaucherova choroba nebo Niemann-Pickova choroba typu C. Posledně jmenovaná choroba se standardně diagnostikuje značením fibroblastů pacientů filipinem. Zjistili jsme, že DDHR velmi dobře značí buňky pacienta s Gaucherovou chorobou, u nichž dochází k patologické akumulaci glukocerebrosidů v lysozomech, zatímco buňky pacienta s NPC značí ne příliš odlišně od kontrolních zdravých fibroblastů. Silný fluorescenční signál po značení DDHR v lysozomech fibroblastů získaných z pacienta trpícího Gaucherovou chorobou ukazuje pravděpodobně na značnou akumulaci membránových komponent a nízký obsah cholesterolu. Zdá se tedy, že by se DDHR mohlo v budoucnosti uplatnit jako jeden z diagnostických nástrojů Gaucherovy choroby.

Po zablokování transportu cholesterolu inhibitorem U18666A, u něhož je uváděno, že napodobuje fenotyp NPC (Cenedella, 2009), byly buňky navzdory očekávání značeny odlišně od kontrolních fibroblastů. Očekávaný výsledek značení byl takový, že fluorescenční signál DDHR bude výrazně zeslaben díky vysoké lokální koncentraci cholesterolu v lysozomech, typický pro tuto chorobu, což jsem však nepozorovala. Výsledek je možné vysvětlit hypotézou, že inhibitor sice rámcově napodobuje fenotyp NPC, ale lipidové složení akumulovaných lysozomů může být odlišné. Při značení filipinem, který interaguje s cholesterolem a fluorescenčně značí oblasti bohaté na cholesterol, se ukázalo, že lze pomocí něj odlišit buňky pacienta s NPC a ovlivněné inhibitorem od zdravých fibroblastů, nikoli však buněk pacienta s Gaucherovou chorobou. Lysozomy buněk, v nichž by měl být díky působení inhibitoru U18666A akumulován hlavně cholesterol, byly tedy označeny DDHR stejně dobře jako filipinem.

Tento výsledek je v rozporu s daty naznačujícími, že fluorescence DDHR je cholesterolem zhasena, DDHR by tedy neměl značit lysozomy obsahující cholesterol tak, jak je značí filipin. Z výsledků kolokalizace lysozomálního LAMP-1 s DDHR provedeným na HeLa buňkách ovlivněných inhibítozem U18666A se však zdá, že na akumulovaných lysozomech existují určité mikrodomény, které mohou být značeny specifickou protilátkou proti LAMP-1 nebo DDHR. Na jednom lysozomu je tedy možné nalézt signály obou těchto markerů, které spolu evidentně nekolokalizují. Existence mikrodomén v membráně lysozomů s odlišným lipidovým složením by mohla vést k vysvětlení, proč DDHR i filipin značí akumulované lysozomy. Existence podobných endozomálních mikrodomén již byla v literatuře popsána (Kobayashi et al., 2002).

## **6.4 Mechanismus vstupu DDHR do buněk a jeho interakce s membránami**

Z experimentů provedených na černých lipidových membránách je vidět jasná závislost mezi přítomností cholesterolu a průběhem zvyšování vodivosti v umělé membráně. Z naměřených dat průběhu vodivosti membrány po její expozici DDHR lze vysledovat určité charakteristické rysy pro membrány s cholesterolem a bez cholesterolu. U membrán obsahujících cholesterol dochází vlivem DDHR v koncentraci 21  $\mu$ M k postupnému plynulému nárůstu vodivosti membrány, bez zaznamenaných krátkých zvýšení vodivosti, které jsou typické pro kanálotvorné molekuly (Obr. 53). Naopak v nepřítomnosti cholesterolu byla na záznamu vidět častá, krátká a poměrně velká zvýšení vodivosti umělé membrány, která se nezdá od sebe lišit ve vodivosti i řádově (Obr. 52). Je tedy jasné, že mechanismus interakce DDHR s membránou se liší dle článku Grigorjev & Bezrukov (1994) (Obr. 65) od roflamykoinu a dalších makrolidů tvořících v membránách s obsahem cholesterolu kanály, jako je například amfotericin B nebo nystatin (Holz & Finkelstein, 1970).

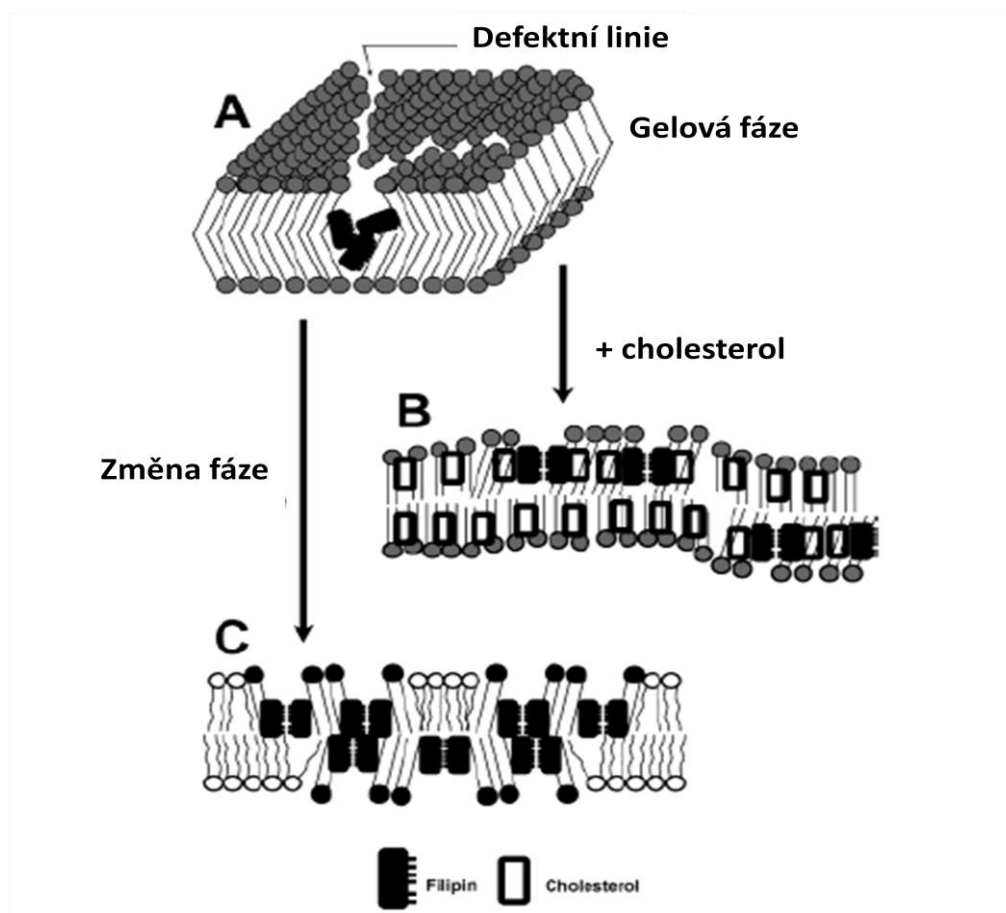


**Obr. 65:** Průběh změn proudu procházející kanály indukovanými roflamykoinem v lipidové dvojvrstvě.

Proud procházející jedním kanálem je  $7,0 \pm 0,4$  pA (1M KBr, 100mV, 20 °C). (převzato z Grigorjev & Bezrukov, 1994).

V souladu s naměřenými daty se zdá, že by DDHR mohl mít podobný charakter vazby do membrán jako filipin, jaký navrhuji autoři publikace Lopes et al. (2004) ve svém modelu uspořádání filipinu v různých typech umělých membrán. Dle tohoto modelu vstupuje filipin do membrán bez cholesterolu (v gelové fázi), v nichž je lokalizován ve středu membránové dvojvrstvy. Zde je orientace jeho molekul poměrně nehomogenní a náhodná (často zde i agreguje), přičemž způsobuje na povrchu membrán defektní linie (Obr. 66 A). Pokud je však v membráně přítomen cholesterol, filipin se orientuje paralelně s acylovými řetězci fosfolipidů blíže k povrchu membrány, přičemž nezpůsobí na povrchu žádné defektní linie (Obr. 66 B). Stejná orientace filipinu byla zjištěna i v tekuté fázi membrány bez cholesterolu, zde je filipin zanořen na rozdíl od membrán s cholesterolem hlouběji a také je velmi nehomogenně distribuován za možného vzniku defektů na povrchu membrány (Obr. 66 C).





**Obr. 66: Model orientace filipinu v membránách.**

(A) Náhodná a nehomogenní distribuce filipinu v membráně v gelové fázi bez cholesterolu za vzniku defektních linií. (B) Orientace filipinu paralelně s acylovými řetězci fosfolipidů a jeho lokalizace blíže k povrchu membrány s cholesterolem. (C) Nehomogenní distribuce filipinu orientovaného paralelně s acylovými řetězci fosfolipidů v membránách v tekuté fázi bez cholesterolu. Filipin je lokalizován blíže centru membrány. (Upraveno podle Lopes et al., 2004).

Námi naměřené charakteristiky vodivosti se zdají být v souladu s tímto modelem. Velké a náhlé fluktuace ve vodivosti u azolipidových membrán (v tekuté fázi) s DDHR bez cholesterolu mohou být způsobeny vznikem defektů na povrchu membrány způsobenými agregací nebo nehomogenní distribucí molekul DDHR v lipidové dvojvrstvě. Naopak v membránách s cholesterolem by mohl být DDHR orientován paralelně s acylovými řetězci (a molekulami cholesterolu), což může způsobovat rozvolnění membrány nebo vznik mnoha malých defektů, které se po dobu vystavení membrány DDHR zmnožují díky kontinuálnímu zabudovávání molekul DDHR do membrány. To by se mohlo projevit právě postupným nárůstem vodivosti membrány. Snížení vodivosti membrány po delší době její expozice DDHR by mohlo být způsobeno tím, že DDHR by mohl podobně jako filipin depletovat cholesterol

z membrán (Rothberg et al. 1990). Po takovém snížení obsahu cholesterolu v membránách se do nich DDHR nezabudovává tak efektivně. S pokračujícím snižováním obsahu cholesterolu v membráně narůstá počet molekul DDHR, které by mohly být podobně jako v membránách bez cholesterolu orientovány náhodně a nehomogenně a způsobovat defekty, které se projeví většími fluktuacemi vodivosti, což jsme také naměřili. Již zmíněná schopnost filipinu depletovat cholesterol z membrán se dnes ve výzkumu velmi často cíleně využívá (Xu et al., 2007) (Matveev & Smart, 2002, Chichili et al., 2010).

Z modelu navrženém v publikaci Lopes et al. (2004) vyplývá, že filipin interaguje s cholesterolem jiným mechanismem než amfoterici B nabo nystatin. Odlišnosti ve struktuře molekul těchto makrolidů vedou autory k úvaze, že ke schopnosti molekuly oligomerizovat a tvořit v membráně kanály je potřeba přítomnost velké hydrofilní skupiny v molekule makrolidu, kterou ani filipin, ani DDHR nemají. Pokud je však tato hypotéza správná, neměl by kanály v membráně tvořit ani roflamykoin, u kterého však byla tato schopnost zjištěna.

Model navržený Lopesem et al. (2004) potvrzují i některé starší práce věnující se problematice vazby a lokalizace filipinu v membránách v přítomnosti a nepřítomnosti cholesterolu (Castanho & Prieto, 1995).

Zjistili jsme také, že propustnost umělé membrány je velmi závislá na koncentraci DDHR. 7 $\mu$ M DDHR nezpůsobil v membráně prakticky žádné změny. Výše popsané charakteristické chování membrán se začalo objevovat až po přidání 14 $\mu$ M DDHR k membránám. Ve 21 $\mu$ M koncentraci DDHR byly tyto charakteristiky již velmi výrazné.

## 6.5 Přímá detekce interakce DDHR s cholesterolem

Měřením pomocí nukleární magnetické rezonance jsme zjistili, že k interakci DDHR/cholesterol v prostředí methanolu nejspíše nedochází. Tím však nebylo vyloučeno, že DDHR s cholesterolem interaguje v prostředí lipidových dvojvrstev. Měření provedená v 80mM SDS metodou infračervená spektroskopie však interakci těchto dvou molekul potvrdily. Cholesterol se na DDHR váže pravděpodobně v oblasti

šestičtetného kruhu (uhlíky C13–C17). Vazbou jsou ovlivněny i vzdálenější oblasti molekuly DDHR. Pro přesnou identifikaci pásů z diferenčního spektra by bylo třeba další podrobnější analýzy.

V budoucnu bychom chtěli využít i NMR spektroskopii k ověření interakce DDHR s cholesterolem v SDS micelách.

## 6.6 Praktická využitelnost DDHR

Během experimentální práce jsem zjistila, že látka DDHR je podobně jako filipin poměrně nestabilní a po delším skladování ztrácí bioaktivitu. Zdá se však, že DDHR je ve srovnání s filipinem stabilnější a své vlastnosti si zachovává déle. Měření na spektrofluorometru ukázalo, že DDHR mění i své fluorescenční vlastnosti. Intenzita fluorescence DDHR skladovaného 2 roky v suchém stavu v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  byla od nově izolovaného DDHR nižší. To je však v rozporu s výsledky měření na průtokovém cytometru, kde naměřená intenzita fluorescence nově izolovaného DDHR byla menší. Možné vysvětlení již bylo v tomto oddíle diskutováno.

V porovnání fluorescenčního spektra s široce používaným filipinem (spektrum filipinu Obr. 11) je jasné, že spektrální vlastnosti DDHR jsou vhodnější pro celou řadu aplikací. Filipin je excitovatelný v kratších vlnových délkách UV oblasti, než je tomu u DDHR, což může způsobit různé artefakty vlivem UV záření. Emise DDHR na rozdíl od filipinu je také lépe odlišitelná od autofluorescence buněk. Díky zhášení fluorescence DDHR cholesterolem by se v budoucnosti mohlo DDHR stát sondou komplementární k filipinu, kdy filipin značí cholesterol bohaté oblasti, naopak DDHR oblasti chudé na cholesterol.

Podobně jako u některých makrolidových léčiv, jejichž antibiotický účinek je založen na jejich silnější interakci s ergosterolem v porovnání s cholesterolem, se z dosud získaných výsledků zdá, že i DDHR vykazuje podobné chování. Zároveň i jasné značení buněk pacienta s Gaucherovou chorobou činí z DDHR perspektivní látku pro aplikaci v medicíně.

Vzhledem k tomu, že se DDHR strukturně vysoce podobá makrolidu roflamykoinu, o kterém je k dispozici pouze omezené množství publikací, je velmi pravděpodobné, že výsledky uvedené v této diplomové práci charakterizují jak DDHR, tak i dnes poměrně málo prostudovaný roflamykoin.

## 7 Závěr

Cíle, které jsem si ve své diplomové práci stanovila, se mi podařilo splnit.

Charakterizovala jsem fluorescenční vlastnosti nově izolovaného metabolitu DDHR ze *Streptomyces durmitorensis* a zjistila jsem tyto skutečnosti:

- Emisní spektrum DDHR je velmi široké, jeho tvar se v použitých rozpouštědlech nemění, výrazně se mění excitační spektra.
- Intenzita fluorescence od polárních rozpouštědel k nepolárním narůstá, ve velmi nepolárních rozpouštědlech není DDHR rozpustné.
- pH má vliv na tvar emisních spekter.
- Se zvyšující se koncentrací DDHR v prostředí pufru TBS se intenzita jeho fluorescence nezvyšuje lineárně.
- V liposomech se steroly vykazuje DDHR nižší intenzitu fluorescence než v liposomech bez sterolů.

Charakterizovala jsem bioaktivitu DDHR na různých buněčných typech:

- DDHR je toxický pro kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* kmene EGY48, ale není toxický pro bakterie *Escherichia coli* kmene DH5α.
- Pro transformované lidské buňky linie Jurkat a HeLa je DDHR toxický od koncentrace 12–25  $\mu\text{M}$ , pro primární lidské kožní fibroblasty nad koncentrací 25  $\mu\text{M}$ .
- DDHR má vliv na aktinový a tubulinový cytoskelet HeLa buněk již od 12  $\mu\text{M}$  koncentrace.
- DDHR způsobuje u lidských buněk přímo nekrózu.

Částečně se mi podařilo objasnit mechanismus interakce DDHR s membránami:

- DDHR vstupuje do membrán nezávisle na obsahu cholesterolu.
- V membránách bez cholesterolu navozuje DDHR v koncentraci  $21\mu\text{M}$  nedefinovaně velké póry, v membránách s cholesterolem mnoho malých pórů.

Nastínila jsem budoucí možné využití DDHR:

- fluorescenční sonda buněčných struktur bez obsahu cholesterolu
- fluorescenční sonda pro lysozomy
- diagnostický nástroj pro Gaucherovu chorobu

Nad rámec vytyčených cílů jsem zjistila:

- DDHR neinteraguje s cholesterolem v prostředí methanolu
- DDHR přímo interaguje s cholesterolem v prostředí SDS micel

# Literatura

- Afzal, M., Nimer, N.D. & Nazar, M. (1983). *Streptomyces maghwi*, a new species producing roflamycoin. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 23(7): 411-8.
- Baginski, M. & Czub, J. (2009). Amphotericin B and its new derivatives – mode of action. *Current drug metabolism*, 10(5): 459-69.
- Barneveld, R.A., Keijzer, W., Tegelaers, F.P., Ginns, E.I., Geurts van Kessel, A., Brady, R.O. et al. (1983). Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Human genetics*, 64(3): 227-31.
- Becker, B. (1965). Chemical composition of cell-wall preparation from strains of various form-genera of aerobic Actinomycetes. *Microbiology*, 13(2), 236-243.
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1): 1-26.
- Behnke, O., Tranum-Jensen, J. & van Deurs, B. (1984). Filipin as a cholesterol probe. II. Filipin-cholesterol interaction in red blood cell membranes. *European journal of cell biology*, 35(2): 200-15.
- Bittman, R., Clejan, S., & Rottem, S. (1983). Transbilayer distribution of sterols in mycoplasma membranes: a review. *The Yale journal of biology and medicine*, 56(5-6): 397-403.
- Bittman, R. & Frischkoff, S.A. (1972). Fluorescence studies of the Binding of the Polyene Antibiotics Filipin III, Amphotericin B, Nystatin, and Lagosin to Cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(12): 3795-9.
- Bolard J., (1986). How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochimica et biophysica acta*, 864(3-4): 257-304.
- Bouvier, P., Rohmer, M., Benveniste, P., & Ourisson, G. (1976). Delta8(14)-steroids in the bacterium *Methylococcus capsulatus*. *The Biochemical journal*, 159(2): 267-71.
- Brasaemle, D. L., & Attie, a D. (1990). Rapid intracellular transport of LDL-derived cholesterol to the plasma membrane in cultured fibroblasts. *Journal of lipid research*, 31(1): 103-12.

- Brautaset, T., Sletta, H., Nedal, A., Borgos, S. E. F., Degnes, K. F., Bakke, I., Volokhan, O., et al. (2008). Improved antifungal polyene macrolides via engineering of the nystatin biosynthetic genes in *Streptomyces noursei*. *Chemistry & biology*, 15(11): 1198-206.
- Caffrey, P., Aparicio, J. F., Malpartida, F., & Zotchev, S. B. (2008). Biosynthetic engineering of polyene macrolides towards generation of improved antifungal and antiparasitic agents. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(8): 639-53.
- Castanho, M. & Prieto, M. (1995). Filipin fluorescence quenching by spin-labeled probes: studies in aqueous solution and in a membrane model system. *Biophysical journal*, 69(1): 155-68.
- Ceder, O. & Ryhage, R. (1964). The Structure of filipin. *Acta Chemica Scandinavica*, 18: 558-61.
- Cenedella, R. J. (2009). Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids*, 44(6): 477-87.
- Chater, K. F., & Chandra, G. (2006). The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS microbiology reviews*, 30(5): 651-72.
- Chichili, G.R., Westmuckett AD., Rodgers W. (2010). T cell signal regulation by the actin cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(19): 14737-46.
- Colbeau, A., Nachbaur, J. & Vignais, PM. (1971). Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 249(2): 462-92.
- Compant, S. et al. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, Sept. 2005: 4951-59.
- Cruz, C., Cairrao, E., Silvestre, S., Breitenfeld, L., Almeida, P., & Queiroz, J. a. (2011). Targeting of mitochondria-endoplasmic reticulum by fluorescent macrocyclic compounds. *PloS one*, 6(11), e27078.
- Cullum, J., Flett, F. & Piendl, W. (1988). Genetic instability in streptomycetes. *Microbiological sciences*, 5(8): 233-5.
- Dahl, J. S., Dahl, C. E., & Bloch, K. (1982). Role of membrane sterols in *Mycoplasma capricolum*. *Reviews of infectious diseases*, 4 Suppl, S93-6.
- De Ley, J., Cattoir, H. & Reynaerts, A. (1970). The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *European journal of biochemistry*, 12(1): 133-42.



- Demel, R.A., Vandeene, L.L. & Kinsky, S.C. (1965). Penetration of lipid monolayers by polyene antibiotics - correlation with selective toxicity and mode of action. *Journal of Biological Chemistry* 240: 2749-53.
- Dousseau F., Therrien M., Pézolet M. (1989) On the spectral subtraction of water from FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins. *Applied Spectroscopy* 43: 538-542.
- Elander, R.P. (1987). Microbial screening, selection and strain improvement. *Basic Biotechnology*, London: Academic Press: 217-51.
- Euzéby, J.P. (2012). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. [www.bacterio.cict.fr](http://www.bacterio.cict.fr)
- Fischer, M. (1996). Fluorescence quantum yield of rhodamine 6G in ethanol as a function of concentration using thermal lens spectrometry. *Chemical Physics Letters*, 261(September), 0-3.
- Gillooly, D. J., Raiborg, C., & Stenmark, H. (2003). Phosphatidylinositol 3-phosphate is found in microdomains of early endosomes. *Histochemistry and cell biology*, 120(6): 445-53.
- Gimpl, G, Burger, K., & Fahrenholz, F. (1997). Cholesterol as modulator of receptor function. *Biochemistry*, 36(36): 10959-74.
- Gimpl, Gerald, & Gehrig-Burger, K. (2007). Cholesterol reporter molecules. *Bioscience reports*, 27(6): 335-58.
- Gimpl, Gerald, & Gehrig-Burger, K. (2011). Probes for studying cholesterol binding and cell biology. *Steroids*, 76(3): 216-31.
- Goldin, E. (2011). Gaucher disease and parkinsonism, a molecular link theory. *Molecular genetics and metabolism*, 101(4): 307-10.
- Gottlieb, M.H. (1977). The reactivity of human erythrocyte membrane cholesterol with a cholesterol oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 466(3): 422-28.
- Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C., & Burke, M. D. (2012). Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7): 2234-9.
- Grigorjev, P. a, & Bezrukov, S. M. (1994). Hofmeister effect in ion transport: reversible binding of halide anions to the roflamycoin channel. *Biophysical journal*, 67(6): 2265-71.
- Hell, S. W., & Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11): 780-2.

- Holz, R. & Finkelstein, A. (1970). The Water and Nonelectrolyte Permeability Induced in Thin Lipid Membranes by the Polyene Antibiotics Nystatin and Amphotericin B. *The Journal of general physiology*, 56(1): 125-45.
- Hopwood, D. A. (2007). How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them? *Molecular microbiology*, 63(4): 937-40.
- Hruska, K. S., LaMarca, M. E., Scott, C. R., & Sidransky, E. (2008). Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Human mutation*, 29(5): 567-83.
- Huang, S., X., Wang, X., J., Yan, Y., Wang, J., D., Zhang, J., Liu, C., X., Xiang, W., S., & Shen, B. et al. (2012). Neaumycin: A New Macrolide from *Streptomyces* sp. NEAU-x211. *Organic Letters*, 14(5): 1254-1257.
- Huß, V.A.R., Festl, H. & Schleifer, K.H. (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridisation from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology*, 4: 184-92.
- Ikonen, E. (2001). Roles of lipid rafts in membrane transport. *Current opinion in cell biology*, 13(4): 470-7.
- Ikonen, E., & Jansen, M. (2008). Cellular sterol trafficking and metabolism: spotlight on structure. *Current opinion in cell biology*, 20(4): 371-7.
- Iwamoto, M., Morita, I., Fukuda, M., Murota, S., Ando, S., & Ohno-Iwashita, Y. (1997). A biotinylated perfringolysin O derivative: a new probe for detection of cell surface cholesterol. *Biochimica et biophysica acta*, 1327(2): 222-30.
- Janssen, G.R. & Bibb, M.J. (1990). Tandem promoters, *tsrp1* and *tsrp2*, direct transcription of the thiostrepton resistance gene (*tsr*) of *Streptomyces azureus*: transcriptional initiation from *tsrp2* occurs after deletion of the -35 region. *Molecular & general genetics: MGG*, 221(3): 339-46.
- Johannes, L., & Mayor, S. (2010). Induced domain formation in endocytic invagination, lipid sorting, and scission. *Cell*, 142(4): 507-10.
- Karten, B., Peake, K. B., & Vance, J. E. (2009). Mechanisms and consequences of impaired lipid trafficking in Niemann-Pick type C1-deficient mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(7): 659-70.
- Kendrickt, K. E., & Ensign, J. C. (1983). Sporulation of *Streptomyces griseus* in submerged Sporulation of *Streptomyces griseus* in Submerged Culture. *Journal of Bacteriology*, 155(1): 357-66.

- Kitagawa, S., Matsubayashi, M., Kotani, K., Usui, K. & Kametani, F. (1991). Asymmetry of membrane fluidity in the lipid bilayer of blood platelets: Fluorescence study with diphenylhexatriene and analogs. *Journal of Membrane Biology*, 119(3): 221-7.
- Kobayashi, Toshihide, Beuchat, M.-H., Chevallier, J., Makino, A., Mayran, N., Escola, J.-M., Lebrand, C., et al. (2002). Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *The Journal of biological chemistry*, 277(35): 32157-64.
- Koh, C. H. V., & Cheung, N. S. (2006). Cellular mechanism of U18666A-mediated apoptosis in cultured murine cortical neurons: bridging Niemann-Pick disease type C and Alzheimer's disease. *Cellular signalling*, 18(11): 1844-53.
- Krainsky, A. (1914). Die Aktinomyceten und ihre Bedeutung in der Natur. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk.*, 41: 649-688.
- Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer US.
- Lange, Y. (1991). Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *Journal of lipid research*, 32(2): 329-39.
- Lange, Y, Ye, J., Rigney, M., & Steck, T. L. (1999). Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *Journal of lipid research*, 40(12): 2264-70.
- Li, Z.G., Mintzer, E. & Bittman, R. (2006). First synthesis of free cholesterol-BODIPY conjugates. *Journal of Organic Chemistry* 71(4): 1718-21.
- Lopes, S.C.D.N., Goormaghtigh, E., Cabral, B.J.C. & Castanho, M.A.R.B. (2004). Filipin Orientation Revealed by Linear Dichroism. Implication for a Model of Action. *Journal of the American Chemical society*, 126(17): 5396-402.
- MacLachlan, J., Wotherspoon, a T., Ansell, R. O., & Brooks, C. J. (2000). Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 72(5): 169-95.
- Martínez-Murcia, a J., Antón, a I., & Rodríguez-Valera, F. (1999). Patterns of sequence variation in two regions of the 16S rRNA multigene family of *Escherichia coli*. *International journal of systematic bacteriology*, 49 Pt 2(1999): 601-10.
- Matveev, S. V., & Smart, E. J. (2002). Heterologous desensitization of EGF receptors and PDGF receptors by sequestration in caveolae. *American journal of physiology. Cell physiology*, 282(4): C935-46.
- Miguélez, E. M., Hardisson, C., & Manzanal, M. B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of cell biology*, 145(3): 515-25.

- Muller, C.P., Stephany, D.A., Winkler, D.F., Hoeg, J.M., Demosky, S.J., Wunderlich, J.R. (1984). Filipin as a flow microfluorometry probe for cellular cholesterol. *Cytometry*, 5(1): 42-54.
- Neufeld, E. B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, a M., Dwyer, N. K., Roff, C. F., et al. (1999). The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *The Journal of biological chemistry*, 274(14): 9627-35.
- Ohno-Iwashita, Yoshiko, Shimada, Y., Waheed, a A., Hayashi, M., Inomata, M., Nakamura, M., Maruya, M., et al. (2004). Perfringolysin O, a cholesterol-binding cytolysin, as a probe for lipid rafts. *Anaerobe*, 10(2): 125-34.
- Palmer, M. (2001). The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 39(11): 1681-9.
- Pelled, D., Trajkovic-Bodennec, S., Lloyd-Evans, E., Sidransky, E., Schiffmann, R., & Futerman, A. H. (2005). Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease. *Neurobiology of disease*, 18(1): 83-8.
- Preston, R. A., Reinagel, P. S., & Jones, W. (1992). Genes Required for Vacuolar Acidity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 131(3): 551-8.
- Robinson, J.M. & Karnovsky, M.J. (1980). Evaluation of the polyene antibiotics filipin as a cytochemical probe for membrane cholesterol. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 28(2): 161-8.
- Rohmer, M., Bouvier, P., & Ourisson, G. (1979). Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(2): 847-51.
- Rossjohn, J., Feil, S. C., McKinstry, W. J., Tweten, R. K., & Parker, M. W. (1997). Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell*, 89(5): 685-92.
- Rothberg, K. G., Ying, Y. S., Kamen, B. a, & Anderson, R. G. (1990). Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *The Journal of cell biology*, 111(6 Pt 2): 2931-8.
- Rychnovsky, S. D., Griesgraber, J. G., & Schlegelt, R. (1995). Stereochemical Determination of Roflamycin: Analysis and Synthetic Correlation Acetonide, (15): 197-210.
- Santos, N.C., Ter-Ovanesyan, E., Zasadzinski, J.A., Prieto, M. & Castanho, M. (1998). Filipin-induced lesions in planar phospholipid bilayers imaged by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* 75(4): 1869-73.

- Savic, M., Bratic, I., & Vasiljevic, B. (2007). *Streptomyces durmitorensis* sp. nov., a producer of an FK506-like immunosuppressant. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 9): 2119-24.
- Schouten, S., Bowman, J. P., Rijpstra, W. I., & Sinninghe Damsté, J. S. (2000). Sterols in a psychrophilic methanotroph, *Methylosphaera hansonii*. *FEMS microbiology letters*, 186(2): 193-5.
- Schlegel, R., Feugner, R., Bradler, G., & Thrum, H. (1971). Flavomycoin, a new polyene antibiotics from *Streptomyces roseoflavus*. Production, isolation and properties. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 11(8): 661-70.
- Schlegel, R., Thrum, H., Zielinski, J., & Borowski, E. (1981). The structure of roflamycoin, a new polyene macrolide antifungal antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, 34(1): 122-23.
- Schroeder, F. (1984). Fluorescent sterols: probe molecules of membrane structure and function. *Progress in Lipid Research*, 23: 97-113.
- Silvius, J. (2003). Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1610(2): 174-183.
- Skoko, N., Vujovic, J., Savic, M., Papic, N., Vasiljevic, B., & Ljubijankic, G. (2005). Construction of *Saccharomyces cerevisiae* strain FAV20 useful in detection of immunosuppressants produced by soil actinomycetes. *Journal of microbiological methods*, 61(1): 137-40.
- Sleat, D. E., Wiseman, J. a, El-Banna, M., Price, S. M., Verot, L., Shen, M. M., Tint, G. S., et al. (2004). Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16): 5886-91.
- Sobo, K., Chevallier, J., Parton, R. G., Gruenberg, J., & van der Goot, F. G. (2007). Diversity of raft-like domains in late endosomes. *PLoS one*, 2(4): e391.
- Soler, L., Caffrey, P., & McMahon, H. E. M. (2008). Effects of new amphotericin analogues on the scrapie isoform of the prion protein. *Biochimica et biophysica acta*, 1780(10): 1162-7.
- Song, L., van Gijlswijk, R. P., Young, I. T., & Tanke, H. J. (1997). Influence of fluorochrome labeling density on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Cytometry*, 27(3): 213-23.
- Stackebrandt, E., Rainey, A., & Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria Classis nov.* *International Journal*, (34): 479-491.

- Stadtman, T.C., Cherkes, A. & Anfinsen, C.B. (1954). Studies on the microbiological degradation of cholesterol. *The journal of biological chemistry*, 206(2): 511-23.
- Steck, T.L., & Lange, Y. (2010). Cell cholesterol homeostasis: mediation by active cholesterol. *Trends in Cell Biology*, 20(11): 680-687.
- Steer, C. J., Bisher, M., Blumenthal, R., & Steven, a C. (1984). Detection of membrane cholesterol by filipin in isolated rat liver coated vesicles is dependent upon removal of the clathrin coat. *The Journal of cell biology*, 99(1 Pt 1): 315-9.
- Stodůlková, E., Kuzma, M., Hench, I. B., Černý, J., Králová, J., Novák, P., Chudíčková, M., et al. (2011). New polyene macrolide family produced by submerged culture of *Streptomyces durmitorensis*. *The Journal of antibiotics*, 64(11): 717-22.
- Strauss, J. F., Kishida, T., Christenson, L. K., Fujimoto, T., & Hiroi, H. (2003). START domain proteins and the intracellular trafficking of cholesterol in steroidogenic cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 202(1-2): 59-65.
- Tabas, I. (2002). Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *The Journal of clinical investigation*, 110(7): 905-11.
- Tanida, A., Hasegawa, H., Iida, Y., Ohya, Y., Anraku, Y. (1995). Cooperation of calcineurin and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis of yeast cells. *The Journal of biological chemistry*, 270(17): 10113-9.
- Tashiro, Y., Yamazaki, T., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y., & Okamoto, K. (2004). Axon-dominant localization of cell-surface cholesterol in cultured hippocampal neurons and its disappearance in Niemann-Pick type C model cells. *The European journal of neuroscience*, 20(8): 2015-21.
- Teerlink, T., de Kruijff, B. & Demel, R.A. (1980). The action of pimarinic, etruscomycin and amphotericin B on liposomes with varying sterol content. *Biochimica et biophysica acta*, 599(2): 484-92.
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 46(4): 327-38.
- Vanier, MT., Millat G. (2003). Niemann-Pick disease type C. *Clinical genetics*, 64(4): 269-281.
- Vincent, M., de Foresta, B., & Gallay, J. (2005). Nanosecond Dynamics of a Mimicked Membrane-Water Interface Observed by Time-Resolved Stokes Shift of LAURDAN. *Biophysical Journal*, 88(6): 4337-4350.
- Waksman, S.A. & Curtis, R.E. (1916). The Actinomyces of the soil. *Soil Science*, 1: 99-134.

- Waksman, S.A. & Henrici, A.T. (1943). The nomenclature and classification of the Actinomycetes. *Journal of bacteriology*, 46(4): 337-41.
- Wang, M. L., Motamed, M., Infante, R. E., Abi-Mosleh, L., Kwon, H. J., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2010). Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes. *Cell metabolism*, 12(2): 166-73.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. a. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., et al. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(4): 463-464.
- Whitfield, G.B., Brock, T.D., Ammann, A., Gottlieb, D. & Carter, H.E. (1955). Filipin, an Antifungal Antibiotic: Isolation and Properties. *Journal of the American, Chemical Society*, 77(18): 4799-4801.
- Woodward, R.D. (1957). Struture and biogenesis of the macrolides. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, 69: 50-58.
- Xu, Y., Henning, R. H., van der Want, J. J. L., van Buiten, a, van Gilst, W. H., & Buikema, H. (2007). Disruption of endothelial caveolae is associated with impairment of both NO- as well as EDHF in acetylcholine-induced relaxation depending on their relative contribution in different vascular beds. *Life sciences*, 80(18): 1678-85.
- Xu, L.-H., Fushinobu, S., Ikeda, H., Wakagi, T., & Shoun, H. (2009). Crystal structures of cytochrome P450 105P1 from *Streptomyces avermitilis*: conformational flexibility and histidine ligation state. *Journal of bacteriology*, 191(4): 1211-9.
- Zotchev, S. B. (2003). Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Current medicinal chemistry*, 10(3): 211-23.